

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus,
dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg im Breisgau
Direktor: Professor Dr. F. Büchner

Veränderungen des Eiweiß-
und Ribonucleinsäurestoffwechsels
der Epidermiszelle
während der Cancerisierung
und im verhornenden
Plattenepithelcarcinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
BERTHOLD VON PEIN
aus Freiburg im Breisgau

1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die Ribonucleinsäure- und Eiweißneubildung
der Epidermiszelle der Maus
während der experimentellen Cancerisierung
und im Carcinom*

Von

W. OEHLERT und B. v. PEIN**

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus,
dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
Direktor: Prof. Dr. F. BÜCHNER

Mit 13 Abbildungen und 2 Tabellen im Text

(Eingegangen am 27. November 1962)



* Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Dissertationsarbeit v. Pein.

In einer großen Anzahl von Veröffentlichungen sind am Beispiel des experimentell durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe erzeugten Hautcarcinoms der Maus die histologischen und cytologischen Veränderungen beschrieben und besprochen worden, die während der Cancerisierung in der Epidermis ablaufen und das Bild des voll ausgebildeten Plattenepithelcarcinoms charakterisieren (DEELMAN 1923; ORR 1938; HAMPERL, GRAFFI und LANGNER 1943; DAMMERT 1957; v. ALBERTINI 1958; SETÄLÄ 1962 u. a.). In neueren Untersuchungen wurden dabei durch die Einbeziehung moderner Methoden wesentliche Ergebnisse über den Ablauf ultrastruktureller Veränderungen der Epidermiszelle während der Cancerisierung und in der Carcinomzelle erhalten (v. ALBERTINI 1953, 1958; PILLAI u. GAUTIER 1960; CHATTERJEE 1960; SETÄLÄ 1961 u. a.). Biochemische (HEIDELBERGER und Mitarb. 1951, 1961; FIALA, SPROUL und FIALA 1955), fluoreszenzmikroskopische (GRAFFI und BIELKA 1959), histochemische (GÖSSNER und ZANDER 1952; KUROIWA 1959) und autoradiographische (BÜCHNER 1961; OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961) Arbeiten

haben unsere Vorstellungen über den Angriffspunkt der cancerogenen Kohlenwasserstoffe an den Strukturelementen der Epidermiszelle vervollständigt und Einblicke in hierbei ablaufende Stoffwechselveränderungen ermöglicht. Vor allem die autoradiographische Untersuchungsmethode erlaubt es, dynamische Stoffwechselvorgänge im Desoxyribonucleinsäure- (DNS-), Ribonucleinsäure- (RNS-) und Eiweiß- (EW-) Stoffwechsel der Einzelzelle zu erfassen und die Veränderungen der Form mit denen des Stoffumsatzes zu korrelieren.

Während derartige Untersuchungen über den Ablauf der DNS-Neubildung und damit über den Mechanismus der Zellneubildung während der Cancerisierung der Mäuseepidermis bereits vorliegen (OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961; BÜCHNER 1961; OEHLERT und COTÉ 1961; EVENSEN 1961), stehen Untersuchungen über den EW- und RNS-Umsatz in der hyperplastischen Epidermis, im Papillom und Carcinom noch aus. Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, durch Bestimmungen der relativen Größe des EW- und RNS-Umsatzes an der mit Methylcholanthren gepinselten Mäuseepidermis, im Papillom und im verhornenden Plattenepithelcarcinom Aufschlüsse darüber zu erhalten, inwieweit die strukturellen Veränderungen an der Epidermis und an der Einzelzelle mit qualitativen und quantitativen Veränderungen des EW- und RNS-Stoffwechsels verknüpft sind.

Versuchsanordnung

Zur Untersuchung gelangten insgesamt 10 männliche weiße Mäuse eines Inzuchtstammes zu verschiedenen Zeiten nach wöchentlich einmaliger Pinselung mit einer 0,25%igen Lösung von Methylcholanthren in Benzol. Je 2 Tiere wurden 2 bzw. 4 Tage nach einmaliger Pinselung, 6 weitere nach Entwicklung von verhornenden Plattenepithelcarcinomen getötet. Ein Tier erhielt 2 Tage, ein weiteres 4 Tage nach einmaliger Pinselung 500 μ C 3 H-Cytidin durch intraperitoneale Injektion. 3 Tiere, bei denen neben einem voll ausgebildeten Carcinom multiple Papillome und hyperplastische Hautbezirke beobachtet wurden, erhielten die gleiche Aktivitätsdosis. 60 Minuten nach einmaliger Injektion von 3 H-Cytidin wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. In der zweiten Versuchsreihe erhielt ein Tier 2 Tage, ein weiteres 4 Tage nach einmaliger Pinselung je 1 mC 3 H-Leucin. Die gleiche Aktivitätsdosis an 3 H-Leucin wurde 3 weiteren Tieren, bei welchen neben Carcinomen Papillome bestanden, intraperitoneal injiziert. Diese Tiere wurden 45 Minuten nach der einmaligen Injektion durch Dekapitation getötet. Von allen Versuchstieren wurden ungepinzelte und gepinzelte Haut sowie Hautstreifen, welche Teile des Carcinoms, Papillome und hyperplastische Haut enthielten, entnommen und in neutralem Formol fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden von den Gewebsstücken 5 μ dicke histologische Schnitte angefertigt. Es wurde jeweils normale, gepinzelte und carcinomatös veränderte Haut eines Versuchstieres auf einen Objektträger aufgezogen. Nach der Entparaffinierung wurden die Objektträger durch Eintauchen in flüssige Emulsion mit einer Emulsionsschicht

überzogen. Nach Expositionszeiten von 5–21 Tagen wurden die Autoradiogramme photographisch entwickelt, fixiert und durch die Emulsionsschicht hindurch mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Von den Versuchstieren, welche ^3H -Leucin erhalten hatten, wurden mehrere Autoradiogramme 6 Wochen lang exponiert, die nach der photographischen Entwicklung ungefärbt blieben.

Quantitative Auswertung der Autoradiogramme

Zur Flächenbestimmung von Zellkernen wurden je 400 Zellkerne mit dem Zeichengerät bei einer Vergrößerung von 1200 gezeichnet und anschließend mit dem Planimeter dreimal umfahren. Gleichzeitig wurden über den gezeichneten Kernen bei den Tieren, die Cytidin erhalten hatten, die Silberkörner im Autoradiogramm ausgezählt. Bei den Präparaten der mit Leucin behandelten Tiere wurden über den verschiedenen Gewebsschnitten mit Hilfe eines Meßquadrates die Silberkornzahlen über einer bestimmten Flächeneinheit bestimmt, wobei unabhängig von Kern bzw. Cytoplasma die Gesamtsilberkornzahl ermittelt wurde. In den gleichen Präparaten wurden über der angeschnittenen quergestreiften Muskulatur auf die gleiche Weise die Silberkornzahlen pro Meßquadrat ermittelt. Diese Werte dienten bei den später durchgeführten Vergleichen als Standardwerte. Auf diese Weise wurden folgende Meßwerte ermittelt, auf deren Bedeutung später eingegangen werden soll:

1. Silberkornzahl pro Fläche des benutzten Meßquadrates für normale Haut, hyperplastische Haut, Papillom und Carcinom bei den Tieren, welche durch intraperitoneale Injektion ^3H -Leucin erhalten hatten.
2. Silberkornzahl pro Fläche des Meßquadrates für quergestreifte Muskulatur bei den unter 1 ausgewerteten Präparaten.
3. Kernflächen in vergleichbaren Planimeterwerten von normaler Haut, hyperplastischer Haut, Papillom und Carcinom.
4. Silberkornzahl pro gemessene Kernfläche in normaler, hyperplastischer Haut, Papillom und Carcinom bei Tieren, denen ^3H -Cytidin injiziert worden war.
5. Silberkorndichten durch Division der ermittelten Silberkornzahlen durch die gemessene Kernfläche.

Ergebnisse

^3H -Leucin

2 Tage nach einmaliger Pinselung mit Methylcholanthren besteht bereits eine deutliche Dickenzunahme der Epidermis, die sowohl auf eine Zellvermehrung als auch auf Kernvergrößerungen zurückzuführen ist. Die vergrößerten Zellkerne besitzen große Nucleolen, die zum Teil der Kernwand anliegen. Die Interzellularbrücken erscheinen verbreitert. Im Autoradiogramm liegen die Silberkörner über der gepinselten Epidermis dichter als über der ungepinselten Haut. Die quergestreifte Muskulatur der Subcutis läßt eine nur sehr geringgradige autoradiographische Schwärzung erkennen. Innerhalb der hyperplastischen Epidermis sind zonale Schwärzungsunterschiede im Autoradiogramm nicht nachweisbar.

4 Tage nach einmaliger Pinselung haben sowohl die Schichtdicke der Epidermis als auch die autoradiographische Schwärzung gegenüber der früheren Versuchszeit deutlich zugenommen. Im cytologischen Bild können keine Veränderungen gegenüber der früheren Versuchszeit aufgefunden werden. In der bindegewebigen Unterlage beob-

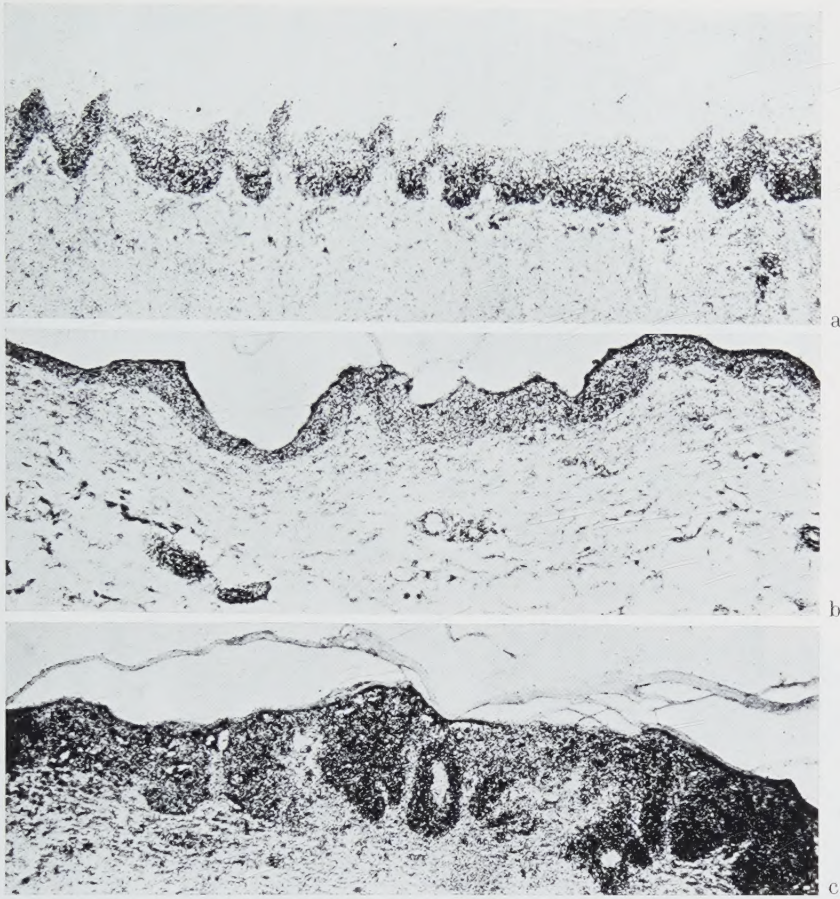


Abb. 1. Ungefärbte Autoradiogramme der Zunge (a), der hyperplastischen Epidermis (b) und eines Papilloms (c) 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin. Deutlich unterschiedliche Schwärzung zwischen unteren und oberen Zellschichten im mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge (a). Diffuse Schwärzung über der gesamten hyperplastischen Epidermis (b) und dem Papillom (c).

achtet man eine größere Zelldichte und ausgeweitete Gefäße und Kapillaren. Es besteht ein beträchtlicher Schwärzungsunterschied zwischen quergestreifter Muskulatur und hyperplastischem Epithel. Zonale Schwärzungsunterschiede zwischen den verschiedenen Epidermisschichten sind nicht nachweisbar. Vergleicht man das autoradiographische Bild des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge als normales, mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel mit dem der hyperplastischen Epidermis, so fällt auf, daß in der Zunge die basalen Zellagen und das untere Drittel des Stratum spinosum weit stärker geschwärzt sind als die oberen Zellschichten. Im hyperplastischen Epithel dagegen reicht die Schwärzung mit gleicher Intensität bis in die obersten Zellagen (Abb. 1a, b).

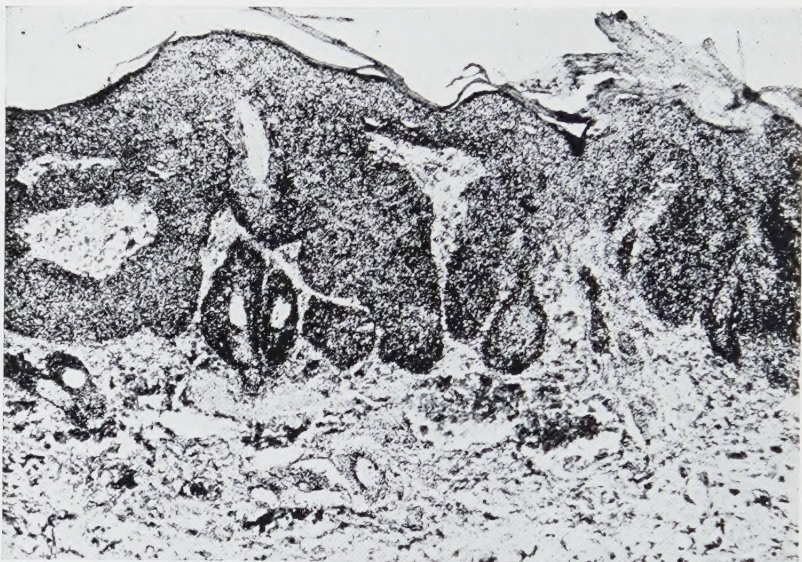


Abb. 2

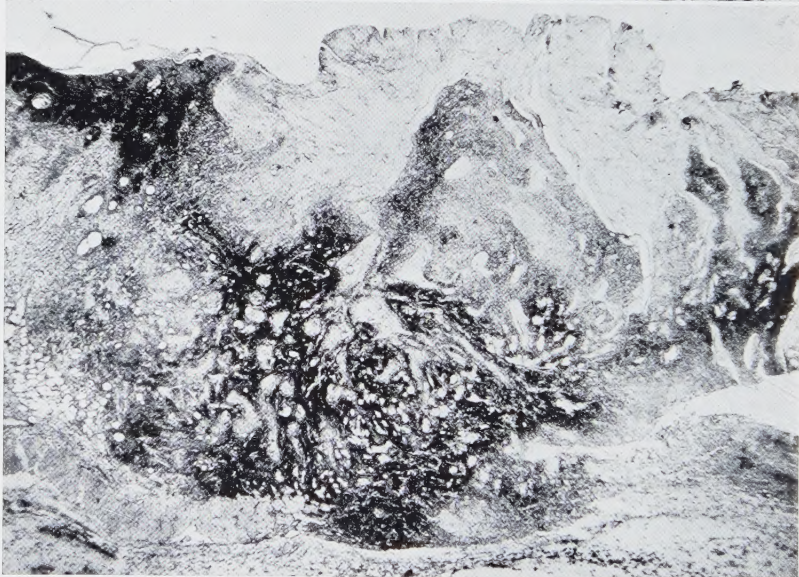


Abb. 3

Abb. 2. Ungefärbtes Autoradiogramm eines Papilloms 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin. Diffuse Schwärzung über allen Zellschichten mit Ausnahme der Hornschicht. Ausgeweitete Gefäße in der bindegewebigen Unterlage.

Abb. 3. Ungefärbtes Autoradiogramm eines verhornenden Plattenepithelcarcinoms 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin. Starke Schwärzung über peripheren Tumorgebiet (unten!). Geringe bis fehlende Schwärzung über Hornmassen und Nekrosen.

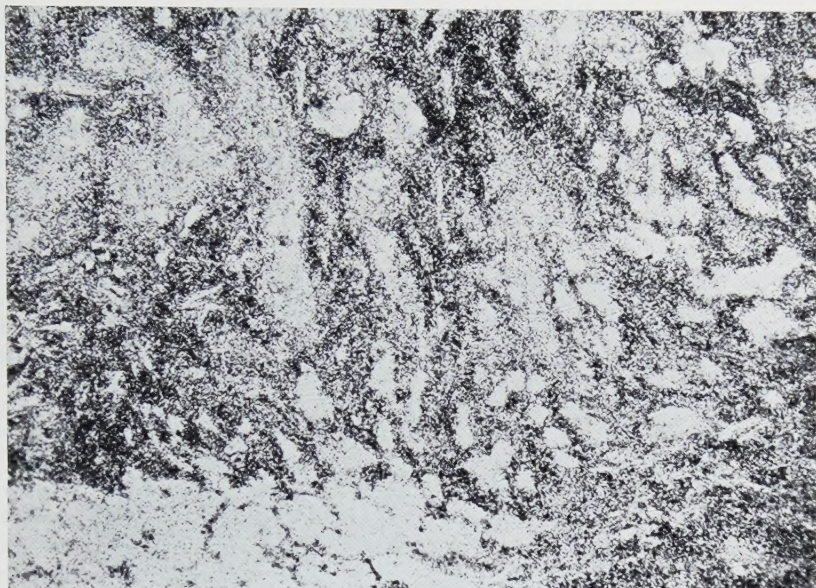


Abb. 4

Abb. 4. Ungefärbtes Autoradiogramm aus der Peripherie eines verhornenden Plattenepithelcarcinoms 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin. Starke Schwärzung über infiltrierend in die Muskulatur einwachsenden Krebszellsträngen. Geringe Schwärzung über Muskelfaserbündeln.

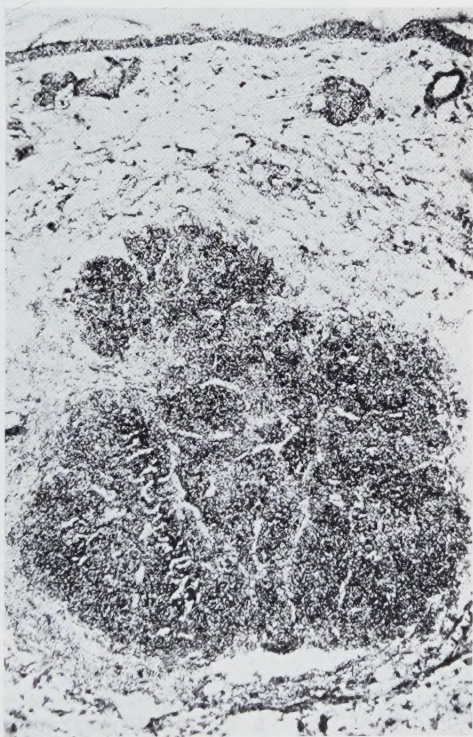


Abb. 5. Ungefärbtes Autoradiogramm eines Krebszellnestes in der Subcutis 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin. Die starke Schwärzung über den Carcinomzellen hebt sich deutlich von der geringen Schwärzung des umgebenden Bindegewebes ab.

Im Papillom hat die autoradiographische Schwärzung gegenüber der hyperplastischen Epidermis entsprechender Versuchstiere in allen 3 untersuchten Tieren geringgradig, aber deutlich zugenommen (Abb. 1 c). Wie in der hyperplastischen Epidermis findet man auch hier eine gleichmäßige Schwärzung über allen Zellschichten bis in das Stratum granulosum hinein. Das Stratum corneum ist frei von nachweisbarer Aktivität (Abb. 1 c, 2). In der bindegewebigen Unterlage beobachteten wir in allen Fällen ausgeweitete und vermehrte Gefäße. Die quergestreifte Muskulatur der Subcutis ist auch unter den Papillomen nur sehr wenig geschwärzt.

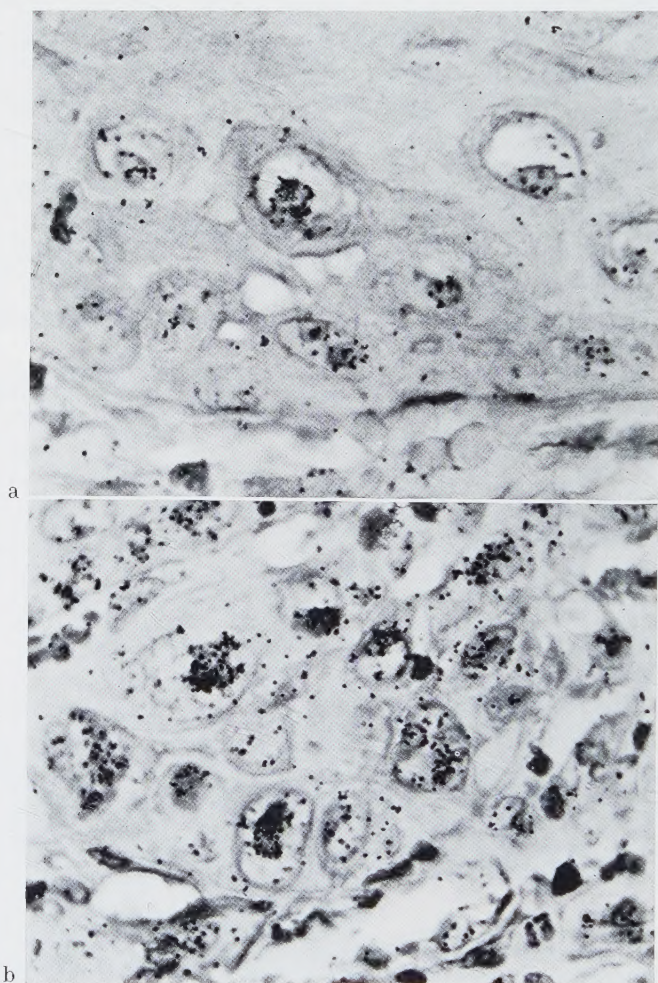
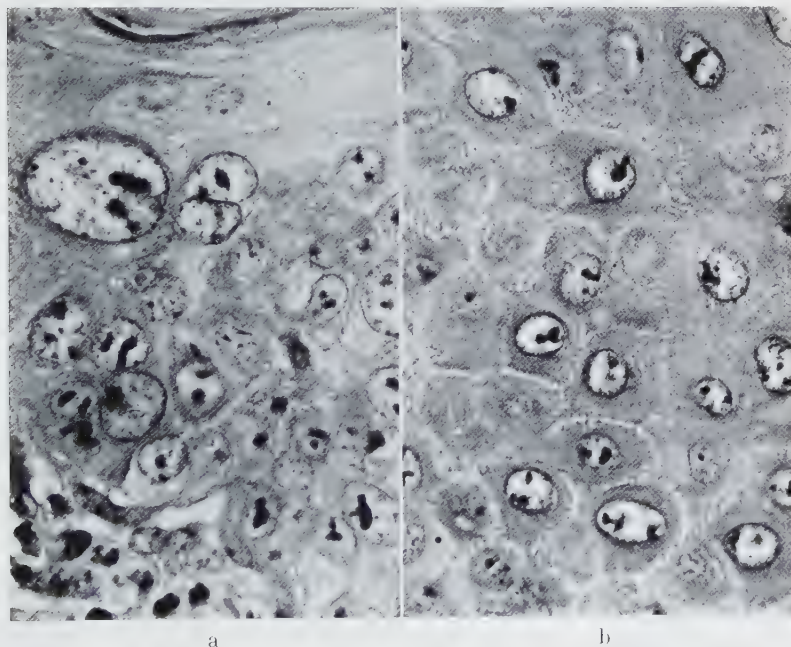


Abb. 6. Gefärbte Autoradiogramme von Zellkernen der hyperplastischen Haut (a) und des Carcinoms (b) eines Versuchstieres 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin. Gleiches Verteilungsmuster der Silberkörner mit dem Maximum über dem Nucleolus. a) und b) gleichlang belichtet.

Im verhornenden Plattenepithelcarcinom aller 3 Versuchstiere findet man ein sehr unterschiedliches autoradiographisches Bild. In der Tumorperipherie besteht eine sehr kräftige autoradiographische Schwärzung. Im Tumorzentrum liegende Nekroseherde und größere Verhornungsbezirke heben sich als helle Flecken aus der sie umgebenden Schwärzung heraus (Abb. 3). In den Bezirken, in denen schmale Zellstränge infiltrierend in die Muskulatur einwachsen, ist das Tumorgewebe stark geschwärzt. Dagegen liegen die erhaltenen Faserbündel als helle Streifen inmitten des Tumorgewebes (Abb. 4). Krebszellnester im Unterhautbindegewebe heben sich auch im ungefärbten Autoradiogramm durch ihre starke Schwärzung deutlich von der Umgebung ab (Abb. 5). Vergleicht man Autoradiogramme gleicher Belichtungszeit von Krebsgewebe mit solchen des Drüsenmagens vom gleichen Versuchstier, so stellt man fest, daß die Einbauaktivität im Krebsgewebe nur wenig geringer als die der Hauptzellen des Drüsenmagens ist.

^3H -Cytidin

Bei der von uns gewählten Versuchszeit von 60 Minuten zwischen Injektion des ^3H -Cytidins und Tötung der Tiere sind im Autoradiogramm die Silberkörner auf den Kern beschränkt. Das Cytoplasma ist weitgehend frei von RNS-Aktivität. Innerhalb des Kerns liegen in der Zelle der normalen Haut, des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge, des hyperplastischen Epithels, des Papilloms und des Carcinoms identische



a

b

Abb. 7. Zellkerne des Carcinoms (a) und des Papilloms (b) bei gleicher Vergrößerung. Vergrößerte Nucleolen zum Teil mit Nucleoproteidbrücken zwischen Nucleolus und Kernmembran.

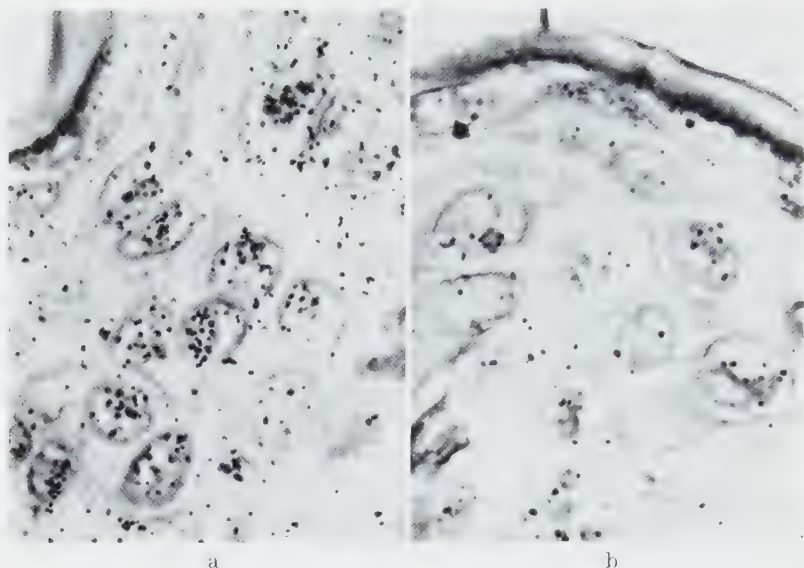


Abb. 8. Gefärbte Autoradiogramme der hyperplastischen Epidermis (a) und des Carcinoms (b) 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin. Gleiches Versuchstier, gleiche Vergrößerung. Größere Silberkornzahl in den Zellkernen des Carcinoms bei etwa gleicher Kerngröße.

Schwärzungsmuster vor. Stets ist der Nucleolus am dichtesten mit Silberkörnern belegt. Im übrigen Kernraum entspricht die Aktivitätsverteilung dem Chromatinmuster des entsprechenden Zellkerns (Abb. 6 a, b).

2 und 4 Tage nach einmaliger Pinselung mit Methylcholanthren findet sich in der gepinselten Haut ein gegenüber der unbehandelten Haut des gleichen Versuchstieres erheblich erhöhter Einbau von ^3H -Cytidin in RNS. Die vergrößerten Kerne der hyperplastischen Epidermis sind stärker mit Silberkörnern belegt als die der unbehandelten Haut, wie dies bereits in einer früheren Arbeit gezeigt wurde (Oehlert, Coté u. Büchner 1961). Das Verteilungsmuster der Silberkörner innerhalb des Kerns hat sich nicht geändert. Sowohl im Papillom als vor allem im Carcinom erfolgt eine weitere Steigerung der RNS-Neubildung im Kern, wenn man die Silberkörner pro Zellkern im Autoradiogramm als Maßstab nimmt.

Bereits im färberischen cytologischen Bild erkennt man als Ausdruck einer gesteigerten Syntheseleistung des Zellkerns vergrößerte, zum Teil randständige Nucleolen sowie Chromatinbahnen vom Nucleolus zur Kernmembran. Im Papillom, noch deutlicher im Carcinom, beobachtet man Einfaltungen der Kernmembran und das Sichtbarwerden von Kernmembran-Nucleotiden (Abb. 7 a, b).

Bei Erhaltenbleiben der typischen Aktivitätsverteilung im Zellkern erkennt man bei einem Vergleich von hyperplastischer Epidermis mit Carcinomgewebe, daß trotz gleicher Kerngröße die Anzahl der Silberkörner pro Zellkern im Carcinom weit größer als in der hyperplastischen Haut ist (Abb. 8 a, b).

Die Markierung der Einzelzelle in den verschiedenen Bezirken der verhornenden Plattenepithelcarcinome ist außerordentlich unterschiedlich. Während die Krebszell-

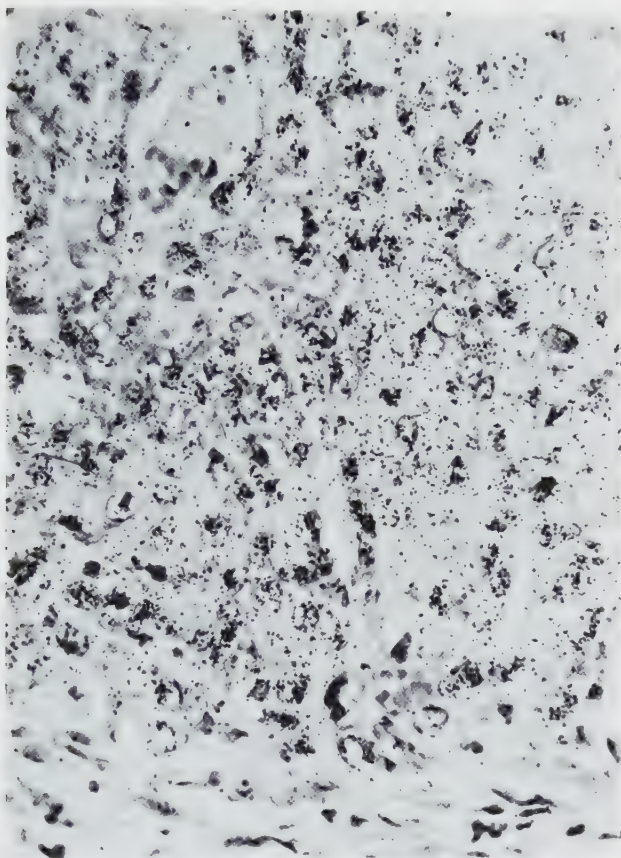


Abb. 9. Gefärbtes Autoradiogramm peripherer Abschnitte eines verhornenden Plattenepithelcarcinoms 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin. Stärkste Silberkornschwärzung der peripheren Tumorzellen.

kerne in peripheren Tumorabschnitten (Abb. 9) und in infiltrierend in die Umgebung einwachsenden Zellsträngen außerordentlich dicht mit Silberkörnern beladen sind, nimmt die Markierung nach dem Tumorzentrum hin ab (Abb. 10). Auch in den geschichteten Verhornungen erkennt man eine Abnahme der Silberkornzahl pro Kern von der Peripherie zum Zentrum hin, obwohl das Kernvolumen sich vergrößert.

Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Autoradiogramme

Durch Auszählung von Silberkörnern innerhalb eines Meßquadrates wurden die Einbauraten von ^3H -Leucin in Muskulatur, normaler Haut, hyperplastischer Haut, Papillom und Carcinom bestimmt. Um die erhaltenen Werte für die verschiedenen Tiere untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils die Silberkornzahl pro Meßquadrat über der quergestreiften Muskulatur der Subcutis als 1 und die für die

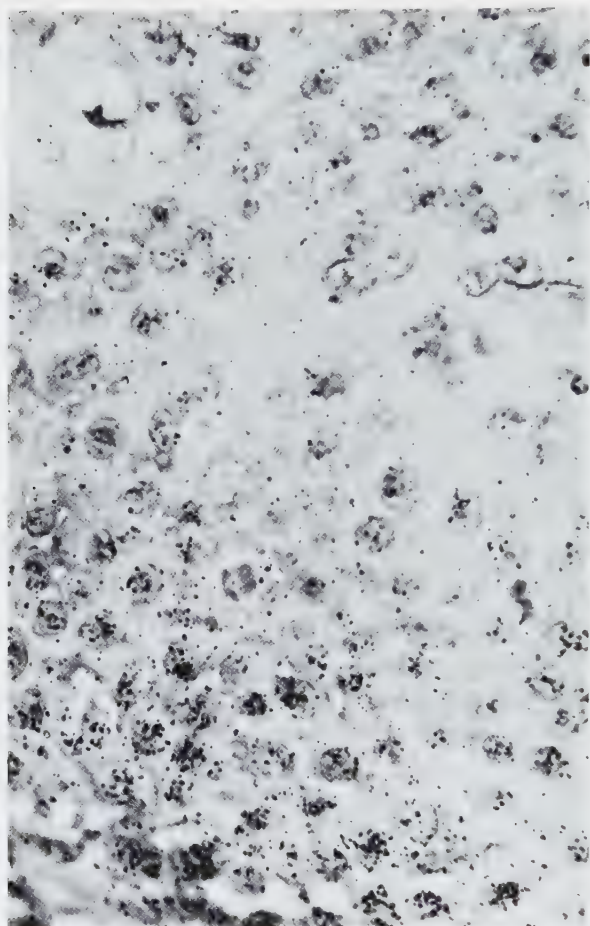


Abb. 10. Gefärbtes Autoradiogramm peripherer und zentraler Tumorabschnitte 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin. Starker Einbau von ^3H -Cytidin in Zellen peripherer Tumorzellen gegenüber geringem Einbau zentraler Gewebsbereiche.

anderen Gewebe ermittelten Werte dazu in Beziehung gesetzt. Jeder in Tabelle 1 angegebene Meßwert ist das Mittel von 50 ausgezählten Meßquadraten.

Wie die Zahlenwerte in Tabelle 1 erkennen lassen, bestehen zwischen den untersuchten 5 Tieren erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Silberkornzahlen pro Meßquadrat identischer Gewebe. So findet man zum Beispiel für die quergestreifte Muskulatur Unterschiede bis zum Faktor 4. Dies ist ein Hinweis dafür, daß trotz gleicher injizierter Aktivitätsdosen erhebliche Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der spezifischen Aktivität der markierten freien Aminosäure bestanden haben dürften. Dagegen sind die Unterschiede, welche zwischen den verschiedenen untersuchten Geweben bestehen, bei jedem Tier etwa die gleichen. So findet man zum Beispiel bei allen Tieren, daß die Einbauaktivität von ^3H -Leucin in die Proteine der quergestreiften

Tabelle 1

Relative Größe des EW-Umsatzes in normaler und hyperplastischer Haut, Papillom und Carcinom nach Methylcholanthrenpinselung.

a = Silberkornzahl pro Flächeneinheit (Mittelwert von 50 ausgezählten Flächen),

b = relative Größe des EW-Umsatzes, gemessen an der Größe der ^3H -Leucin-Inkorporation, bezogen auf Muskulatur = 1

Gewebe	a Silber- kornzahl	b Relative Größe des EW- Umsatzes	
Muskulatur	68,2	1,0	2 Tage nach einmaliger Pinselung
Normale Haut	679,45	9,95	
Hyperpl. Haut	780,54	11,40	
Muskulatur	15,5	1,0	4 Tage nach einmaliger Pinselung
Normale Haut	286,8	18,1	
Hyperpl. Haut	681,7	43,9	
Muskulatur	45,5	1,0	Carcinom-Tier 1
Normale Haut	456,6	10,0	
Hyperpl. Haut	554,4	12,1	
Papillom	764,2	16,8	
Carcinom	1115,2	24,5	
Muskulatur	18,3	1,0	Carcinom-Tier 2
Normale Haut	256,3	14,0	
Hyperpl. Haut	681,7	37,2	
Papillom	721,8	39,4	
Carcinom	1520,0	83,0	
Muskulatur	52,0	1,0	Carcinom-Tier 3
Normale Haut	478,0	9,2	
Hyperpl. Haut	665,0	12,7	
Papillom	781,0	15,1	
Carcinom	1221,3	23,4	

Muskulatur etwa 10mal niedriger liegt als die der normalen Epidermis. Dieses Verhältnis entspricht auch weitgehend dem in einer früheren Arbeit gefundenen Wert, der bei Einbauversuchen mit markierten Thioaminosäuren ermittelt wurde (Niklas u. Oehlert 1956). An Abbildung 11 wurden die in der Tabelle 1 zusammengefaßten Werte graphisch aufgetragen, um einen besseren Überblick über die Gesamtheit und die weitgehende Übereinstimmung der bei Untersuchungen an verschiedenen Tieren erhaltenen Ergebnisse zu geben.

Wie bereits erwähnt, wurden bei den Versuchstieren, die ^3H -Cytidin erhalten hatten, gleichzeitig die Kernflächen und die Silberkornzahlen über den entsprechenden

Zellkernen im Autoradiogramm der verschiedenen untersuchten Gewebe bestimmt. Als Vergleichswert wurde für jedes Tier das mehrschichtige Plattenepithel der Zunge mituntersucht. In Tabelle 2 sind die erhaltenen Meßwerte für Kernflächen (in Planimetereinheiten) und Silberkornzahlen eingetragen. Alle Werte stammen von einem Versuchstier und sind Mittelwerte von jeweils 50 gemessenen und ausgezählten Zellkernen. Da die Verhältnisse zwischen Kerngrößen und Silberkornzahl in allen untersuchten Tieren für die verschiedenen Gewebe gleich waren, werden nur die Werte für ein Tier angegeben.

Im mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge wurden die Kerne mittlerer Zelllagen des Stratum spinosum zur Auswertung herangezogen. Ebenso in der hyperplastischen Haut und im Papillom. Im Carcinom kamen vor allem periphere Tumorabschnitte zur Untersuchung.

In Spalte 3 der Tabelle 2 sind die Silberkorndichten eingetragen, welche durch Division der Kernfläche durch die Zahl der Silberkörner erhalten wurden. Ein Vergleich der Zahlen zeigt, daß im Plattenepithel der Zunge, in der hyperplastischen Epidermis und im Papillom die Silberkorndichte nahe bei 0,1 liegt. Im Carcinom liegt sie bei fast allen untersuchten Zellen bei 0,2, also doppelt so hoch. Unter der Voraussetzung, daß die Silberkorndichte im Autoradiogramm ein Maß für die Größe der RNS-Neubildung pro Vol.-Einheit Kern darstellt, würde dies bedeuten, daß im

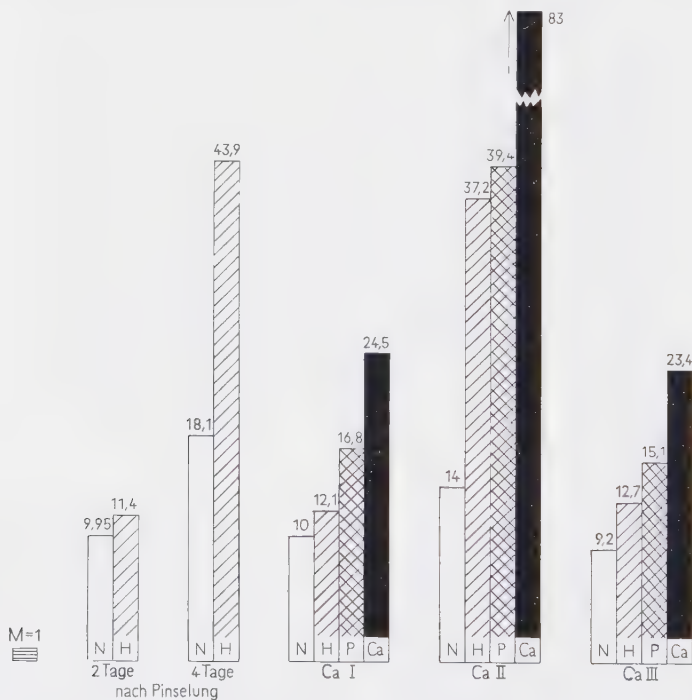


Abb. 11. Relative Größe der Eiweißneubildung (Silberkornzahl pro Flächeneinheit) der normalen und hyperplastischen Epidermis, des Papilloms und des Carcinoms bei 5 Versuchstieren. Muskulatur = 1 (gemessen an der ^3H -Leucinincorporation). N = normale Haut, H = hyperpl. Haut, P = Papillom, Ca = Plattenepithelcarcinom.

Tabelle 2

Kernflächen, Silberkornzahl und Silberkorndichte von Zellkernen des Plattenepithels der Zunge, der hyperplastischen Haut, des Papilloms und des Carcinoms eines Versuchstieres

Kernfläche	Silberkörner	Silberkorndichte	
RNS-Zunge			
37,0	2,0	0,054	
48,8	4,2	0,088	
64,0	6,6	0,100	
62,4	5,8	0,092	
58,4	5,0	0,084	
71,6	7,2	0,090	
77,6	5,0	0,060	
93,6	7,2	0,074	Mittelwert = 0,08
RNS-Hyperplastische Haut			
55,8	5,4	0,09	
66,2	5,4	0,08	
75,8	7,4	0,09	
78,2	8,5	0,10	
92,0	9,8	0,10	
115,4	10,4	0,09	
132,0	11,0	0,08	
153,0	14,0	0,09	Mittelwert = 0,09
RNS-Papillom			
79,0	6,3	0,079	
95,6	7,0	0,070	
97,6	10,0	0,13	
103,8	14,2	0,13	
120,6	10,8	0,09	
119,0	14,0	0,11	
157,2	10,8	0,069	
156,4	14,0	0,09	Mittelwert = 0,098
RNS-Carcinom			
34,2	14,4	0,42	
65,0	25,0	0,38	
68,4	14,2	0,20	
62,65	6,25	0,09	
104,2	16,4	0,15	
145,8	33,6	0,23	
141,7	29,2	0,20	
92,2	26,4	0,28	Mittelwert = 0,24

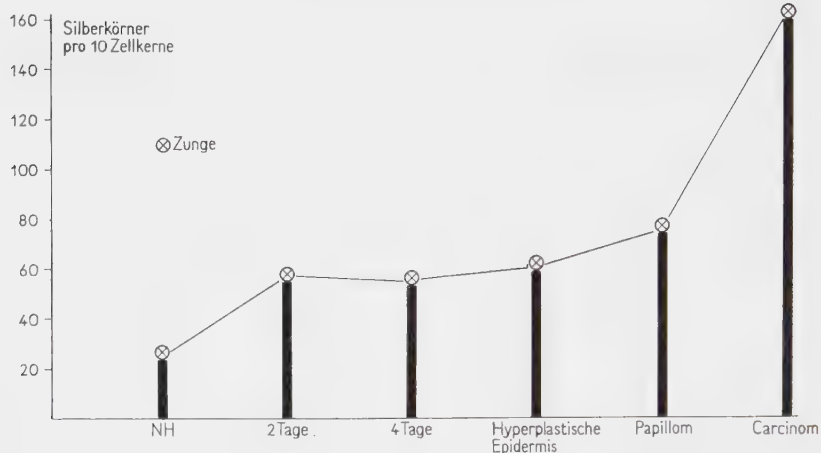


Abb. 12. Relative Größe der RNS-Synthese in normaler und hyperplastischer Epidermis, im Papillom und im Carcinom im Vergleich mit dem mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge. Relative Größe der RNS-Neubildung (gemessen am Einbau von ^3H -Cytidin).

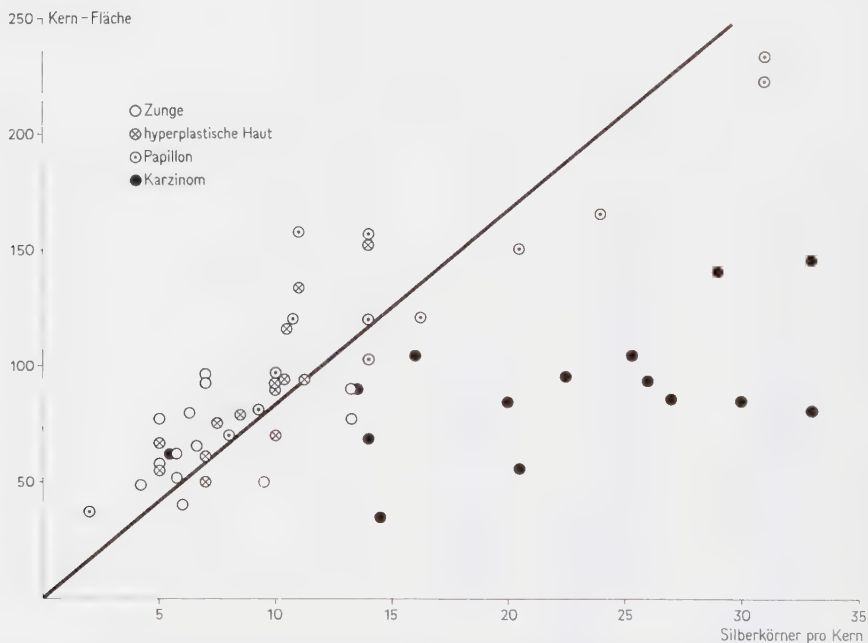


Abb. 13. Verhältnis zwischen relativer Größe der RNS-Synthese und Kerngröße im mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge, im hyperplastischen Epithel, im Papillom und im Carcinom. Weitgehende Parallelität zwischen Kerngröße und relativer Größe der RNS-Neubildung bis zum Papillom. Verlust der Parallelität im Carcinom.

Carcinomgewebe und nur dort eine Steigerung der Syntheseaktivität pro Vol.-Einheit Kern stattfindet.

In Abbildung 13 wurden Kernflächen und Silberkornzahl in ein Ordinatensystem eingetragen, um diese Verschiebung des Verhältnisses Kerngröße zu Einbauaktivität zugunsten der Einbauaktivität noch deutlicher herauszustellen.

In Abbildung 12 ist die Steigerung der RNS-Neubildung pro Kern von der normalen Haut über die Hyperplasie und das Papillom bis zum Carcinom graphisch wiedergegeben.

Theoretische Voraussetzungen für die Auswertung der Ergebnisse

^3H -Leucin

In einer Reihe früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nach Applikation radioaktiv markierter Aminosäuren im Warmblüterorganismus sehr schnell eine Gleichverteilung im Pool der freien Aminosäuren erfolgt, aus dem sie dann von der Zelle entnommen und in Proteine eingebaut werden (NIKLAS u. OEHLERT 1956; MAURER 1960). Bei gleichem zeitlichem Verlauf der spezifischen Aktivität der freien, markierten Aminosäure in der Gewebsflüssigkeit eines Organismus kann die im Autoradiogramm nachweisbare, von markierten, fällbaren Proteinen ausgehende Schwärzung als unmittelbares Maß für die Größe der Inkorporationsrate der entsprechenden Aminosäure genommen werden (MAURER 1960). Da für zahlreiche markierte Aminosäuren das Inkorporationsschema im Organismus weitgehend identisch war, darf angenommen werden, daß die Inkorporationsgröße einer Aminosäure, in unserem Falle des ^3H -Leucins als Maß für die relative Größe der Proteinsynthese einer bestimmten Zellart genommen werden kann (SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1960). Die als Voraussetzung für vergleichende Untersuchungen über die relative Größe der Eiweißneubildung geltende gleiche spezifische Aktivität der freien Aminosäure ist dann weitgehend erfüllt, wenn diese Untersuchungen am gleichen Tier bzw. innerhalb bestimmter, benachbarter Gewebsbezirke durchgeführt werden. Bei gleicher Behandlung der Gewebsschnitte und gleichen Belichtungszeiten kann die autoradiographische Schwärzung als Maß für die relative Größe der Eiweißneubildung gelten. Schwieriger liegen die Verhältnisse, wenn Vergleiche zwischen bestimmten Geweben verschiedener Versuchstiere durchgeführt werden sollen. Selbst bei Verabreichung gleicher Aktivitätsdosen, das heißt gleicher Mengen markierter Aminosäuren gleicher spezifischer Aktivität, können unterschiedliche Resorptionsverhältnisse und Unterschiede im Körpergewicht Veränderungen des zeitlichen Verlaufs der spezifischen Aktivität im Serum hervorrufen, die ihrerseits die Inkorporationsgröße so beeinflussen, daß Vergleiche nicht möglich sind. Um jedoch auch die bei den frühen Versuchszeiten ermittelten Silberkornwerte für normale und hyperplastische Haut mit den bei späteren Versuchszeiten erhaltenen Werten für das Papillom und Carcinom vergleichen zu können, haben wir bei jeder Versuchszeit im gleichen Gewebsschnitt quergestreifte Muskulatur mit ausgewertet und uns somit einen Vergleichswert geschaffen. Für jedes ausgewertete Präparat wurden der für die quergestreifte Muskulatur pro Meßquadrat ermittelte Silberkornwert = 1 und die Werte für normale Epidermis, Hyperplasie, Papillom und Carcinom dazu in Beziehung gesetzt. Die so erhaltenen Relationen sind von Tier zu Tier vergleichbar und geben das Verhältnis zwischen Größe der EW-Neubildung in der Muskulatur einerseits und Epidermis, Hyperplasie, Papillom bzw. Carcinom andererseits an.

^3H -Cytidin

Ähnliche Verhältnisse wie für die Bestimmung der relativen Größe der EW-Neubildung durch Schwärzungsvergleiche im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Leucin gelten auch für die Auswertung der Autoradiogramme nach Injektion von ^3H -Cytidin. Hierbei wurde die Silberkornzahl in den Zellkernen des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge für die einzelnen Tiere als Vergleichswert genommen. Die in Tabelle 2 und in Abb. 13 aufgetragenen Werte stammen von 1 Versuchstier. In Abbildung 12 sind die Werte von 3 Tieren zusammengefaßt, bei denen der Meßwert für die Zunge identisch war.

In einer ganzen Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ^3H -Cytidin vorwiegend in die RNS, weniger auch in die DNS der Warmblüterzelle eingebaut wird (FITZGERALD u. VINIJCHAIKUL 1959; GOLDSTEIN u. MICOU 1959; OEHLERT 1961; SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1961; FEINENDEGEN, BOND u. HUGHES 1961; STÖCKER 1962). Wir werden demnach nach Injektion von ^3H -Cytidin im Autoradiogramm dort eine Schwärzung finden, wo während der Versuchszeit neugebildete, markierte RNS und DNS lokalisiert sind.

Nun ist das Verteilungsmuster radioaktiv markierter RNS bei der von uns gewählten Versuchszeit ein anderes als das der markierten DNS. Während nach einer Markierung der DNS im Autoradiogramm ein der Chromatinverteilung entsprechendes Schwärzungsmuster gefunden wird, wobei der Nucleolus ausgespart bleibt, liegt das Maximum der RNS-Markierung über dem Nucleolus. Dieses Kriterium haben wir unserer Auswertung zugrunde gelegt. Es wurden nur solche Zellkerne für die Kernmessung und die Auszählung der Silberkörner herangezogen, bei denen der angeschnittene Nucleolus dicht mit Silberkörnern bedeckt war.

Unter diesen Voraussetzungen können die ermittelten Silberkornzahlen pro Zellkern als Maß für die relative Größe der Neubildung fällbarer RNS gelten. Wir sind uns der Tatsache bewußt, daß wir damit nur Aussagen über die Stoffwechselaktivität der Fraktion der makromolekularen RNS erhalten und daß die hier geschilderten Stoffwechselveränderungen nur für diese Fraktion Gültigkeit besitzen.

Besprechung der Ergebnisse

EW-Neubildung während der Cancerisierung der Epidermis

Wie die Ergebnisse vorliegender Untersuchungen zeigen, wird durch die Pinselung mit einem Carcinogen, in unserem Falle Methylcholanthren, bereits nach einmaliger Behandlung eine Zunahme der ^3H -Leucin-Inkorporation in die Proteine der gepinselten Epidermis hervorgerufen. Während unter normalen Verhältnissen das oberflächliche Plattenepithel der Haut einen etwa 10mal größeren EW-Umsatz besitzt als die quergestreifte Muskulatur (NIKLAS und OEHLERT 1956), verschiebt sich dieses Verhältnis mit zunehmender Versuchszeit zugunsten der Epidermis, und 4 Tage nach einmaliger Pinselung liegt die relative Größe der EW-Neubildung im hyperplastischen Epithel bereits um den Faktor 40 über derjenigen der quergestreiften Muskulatur des gleichen Versuchstieres. Wenn auch

nicht in diesem Ausmaß, so doch verhältnismäßig deutlich, nämlich um den Faktor 2, nimmt während des gleichen Zeitraumes auch die Einbauaktivität der ungepinselten Haut des gleichen Versuchstieres zu. Entsprechend den Versuchsergebnissen von HEIDELBERGER und WIEST (1951), die nachweisen konnten, daß polyzyklische Kohlenwasserstoffe nach lokaler Applikation resorbiert und in den Kreislauf gelangen, und in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen mehrerer Autoren (ARLEY und IVERSEN 1952; IVERSEN und EDELSTEIN 1952), die auch in der ungepinselten Haut von Versuchstieren eine signifikante Steigerung der Mitoseaktivität bzw. elektronenmikroskopisch faßbare Strukturveränderungen an der Mäusehaut nach oraler Applikation von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (SETÄLÄ, NISKANEN, MERENMIES, NYHOLM und STJERNVALL 1961) nachweisen konnten, müssen wir annehmen, daß die gesteigerte Einbauaktivität der ungepinselten Haut unserer Versuchstiere Folge des resorbierten und auf diese Weise zur Wirkung gelangenden Methylcholanthrens sind. Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, daß bei den Versuchstieren, die Carcinome entwickelt hatten und die deshalb nicht mehr gepinselt worden waren, sich das Verhältnis zwischen Einbauaktivität, Muskulatur und unbehandelter Haut wieder normalisierte, und zwar bei allen 3 untersuchten Tieren (Abb. 13).

Mit der Entwicklung zum Papillom erfolgt, wie Untersuchungsergebnisse an 3 verschiedenen Tieren übereinstimmend ergaben, gegenüber der hyperplastischen Haut eine weitere Zunahme der Einbauaktivität von ^3H -Leucin in die Proteine der Epidermiszellen, die jedoch nicht so eindrucksvoll wie die Steigerung gegenüber der unbehandelten Haut bei früheren Versuchszeiten ist. Weit deutlicher ist die Zunahme der EW-Neubildung im voll ausgebildeten Plattenepithelcarcinom. In allen 3 Versuchen liegt die relative Größe der Proteinsynthese in den Carcinomen um das Doppelte höher als im Papillom der entsprechenden Tiere. Ein Vergleich mit den EW-sezernierenden Hauptzellen des Drüsenmagens, welche zusammen mit Pankreasepithelien und Ganglienzellen den größten EW-Umsatz aller Zellen des tierischen Organismus besitzen (NIKLAS und OEHLERT 1956; FICQ und BRACHET 1956; SCHULTZE, OEHLERT und MAURER 1960), zeigt, daß in den Zellen des Plattenepithelcarcinoms der Maus ein nur wenig geringerer Eiweißumsatz abläuft. Dies gilt jedoch nur für die Zellen infiltrierend wachsender, also peripherer Carcinombezirke. In zentralen Tumorabschnitten, in denen Verhornungsprozesse ablaufen, und vor allem in nekrotischen Gewebsbezirken liegt der EW-Umsatz erheblich niedriger und erreicht meist nicht einmal die Größe der EW-Synthese des hyperplastischen oder normalen Plattenepithels.

Dieser Befund vermag die erheblichen Differenzen zu erklären, welche zwischen den Untersuchungsergebnissen zahlreicher Autoren bestehen, die unter Verwendung markierter Aminosäuren auf biochemischem Wege den EW-Umsatz in bösartigen Tumoren untersucht haben (Lit. bei GRAFFI, S. 353). Bei derartigen Untersuchungen werden nach Applikation markierter Aminosäuren große Gewebeproben untersucht, wobei in Abhängigkeit von dem Alter und dem Differenzierungsgrad des Tumors unterschiedlich große Nekroseherde und Verhornungsbezirke mit zur Untersuchung kommen. Solche Untersuchungen können demnach nur Mittelwerte liefern, die in Abhängigkeit vom histologischen Aufbau des Tumors erheblichen Schwankungen unterliegen.

Der verminderte oder fehlende Einbau in die Proteine zentraler Tumorabschnitte ist mit größter Wahrscheinlichkeit auf die in diesen Gewebsbezirken verminderte Blutversorgung zurückzuführen, die ein vermindertes Angebot an Aminosäuren zur Folge hat. Unsere Beobachtung, daß in peripheren Tumorabschnitten und vor allem in den infiltrierend in die Muskulatur einwachsenden Zellsträngen ein besonders großer EW-Umsatz abläuft, stimmt weitgehend mit den Untersuchungsergebnissen CASPERSSONS (CASPERSSON, NYSTRÖM und SANTESSON 1941) überein, der in den von ihm als A-Zellen bezeichneten Zellelementen peripherer Tumorbereiche einen größeren cytoplasmatischen RNS-Gehalt feststellen konnte als in den „B-Zellen“ zentraler Tumorabschnitte. Wie in den normalen Geweben des tierischen Organismus (NIKLAS und OEHLERT 1956; FICQ und BRACHET 1956; SCHULTZE, OEHLERT und MAURER 1960) geht demnach auch im carcinomatösen Gewebe der cytoplasmatische RNS-Gehalt der Größe der cytoplasmatischen EW-Synthese parallel.

Neben diesen durch quantitative Auswertung der Autoradiogramme erhaltenen Aussagen über die relative Größe der EW-Neubildung im Plattenepithel während der Cancerisierung und im Carcinom konnten wir auch qualitative Unterschiede des Einbaumusters von ^3H -Leucin zwischen dem normalerweise mehrschichtigen Plattenepithel und dem hyperplastischen Epithel feststellen. Wie die Schwärzungsverteilung im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Leucin erkennen läßt, ist im mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge der stärkste Aminosäureeinbau im Stratum basale und in den tiefen Schichten des Stratum spinosum nachweisbar.

Unter der Voraussetzung einer Proportionalität zwischen cytoplasmatischem RNS-Gehalt und der Größe der EW-Neubildung steht dieser Befund in absoluter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SANDRITTER (1953), der in UV-mikrospektrophotometrischen Untersuchungen

am verhornten und nichtverhornenden Plattenepithel mit zunehmender Schichthöhe eine Abnahme des cytoplasmatischen RNS-Gehaltes der Epidermiszellen nachweisen konnte.

Bereits in der hyperplastischen Haut und noch deutlicher im Papillom bestehen diese Unterschiede nicht mehr. Bis zum Stratum corneum hin bauen alle Zellschichten mit etwa der gleichen Intensität Aminosäuren in ihre Proteine ein. Die Ursache für diese Beobachtung könnte einmal in einer gegenüber der Norm veränderten Diffusionsgeschwindigkeit vom Stratum spinosum aus in höhere Zellagen hinein liegen oder aber in einer Veränderung des Stoffwechsels der Zellen des Stratum spinosum im hyperplastischen Epithel gegenüber denen des normalerweise mehrschichtigen Plattenepithels. Die erstere Annahme setzt voraus, daß der in höheren Schichten des Stratum spinosum des mehrschichtigen Plattenepithels geringere Aminosäureeinbau in Proteine Folge eines gegenüber den basalen Zellagen verminderten Aminosäureangebotes ist. Berücksichtigt man die Tatsache, daß das mehrschichtige Plattenepithel keine Kapillarversorgung besitzt und die Zellen durch einen von den Gefäßen der bindegewebigen Unterlage ausgehenden Diffusionsstrom mit Aufbaustoffen versorgt werden, so wäre es ohne weiteres denkbar, daß die Konzentration freier Aminosäuren mit zunehmendem Diffusionsweg geringer wird. In diesem Falle wäre der unterschiedliche Einbau in oberen und unteren Zellagen des mehrschichtigen Plattenepithels nicht durch eine unterschiedliche Stoffwechselintensität, sondern durch das unterschiedliche Angebot an Aminosäure bedingt. Tatsächlich beobachten wir mit zunehmender Hyperplasie und beim Papillom eine gegenüber der Norm verbesserte Blutversorgung durch Neubildung und Ausweitung von Gefäßen der bindegewebigen Unterlage. Die Blutversorgung des hyperplastischen Epithels dürfte demnach besser gestellt sein als die des normalen Plattenepithels. Diese verbesserte Gefäßversorgung durch Gefäßneubildung könnte wohl eine Zunahme der Einbauaktivität in unteren Zellagen, nicht aber den Verlust des für das mehrschichtige Plattenepithel typischen Einbaumusters erklären. Damit wird die Annahme wahrscheinlicher, daß die Veränderung des Schwärzungsmusters im Autoradiogramm Folge eines veränderten EW-Umsatzes der Einzelzellen ist. Während im normalen mehrschichtigen Epithel die an die Oberfläche abwandernden Zellen mit zunehmender „Reifung“ ihre Syntheseaktivität vermindern, ist dies im hyperplastischen Epithel und im Papillom anscheinend nicht der Fall. Die Tatsache, daß dies nicht nur für die hyperplastische Haut während der fortlaufenden Pinselfung, sondern auch für die nicht mehr gepinselte Hauthyperplasie und das Carcinom gilt, spricht gegen die Annahme, daß

diese Stoffwechselveränderung ausschließlich Folge der direkten Einwirkung des Carcinogens ist. Anscheinend handelt es sich bei diesem Verhalten um den Ausdruck einer durch das Carcinogen zwar hervorgerufenen, aber später in der Eigenart der Zelle begründeten Änderung ihres Stoffwechselverhaltens.

Nehmen wir auf Grund der autoradiographischen Beobachtungen am normalen mehrschichtigen Plattenepithel an, daß der zunehmenden „Reifung“ der Zellen des Stratum spinosum eine Verminderung der Proteinsynthese parallel geht, dann würden die besprochenen Beobachtungen am hyperplastischen und am mehrschichtigen Epithel der Papillome als Ausdruck einer verzögerten Zellreifung und der damit verbundenen Erhaltung eines gesteigerten EW-Umsatzes zu werten sein.

Während in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn, das heißt unter der Wirkung der Methylcholanthrenpinselung, diese verzögerte „Reifung“ oder Differenzierung auf den direkten Einfluß des Carcinogens zurückgeführt werden muß, dürfte diese Differenzierungsstörung an der voll ausgebildeten Hyperplasie bzw. beim Papillom nach Absetzen des Carcinogens in der Eigenschaft dieser Zellen selbst begründet liegen. Auf diese Fragen wird in einem späteren Teil der Arbeit noch einzugehen sein.

Veränderungen im RNS-Stoffwechsel der Epidermiszelle während der Cancerisierung und im Carcinom

Die Steigerung der cytoplasmatischen EW-Neubildung nach der Pinselung mit Methylcholanthren in der hyperplastischen Haut, im Papillom und im Carcinom legte bereits die Vermutung nahe, daß auch eine Zunahme der RNS-Neubildung im Kern der betreffenden Zellen vorliegt. Wir wissen heute, daß die cytoplasmatische Eiweißsynthese an die Anwesenheit von RNS gebunden ist (CASPERSSON 1941, 1950; BRACHET 1957). Dabei hat die RNS einmal die Aufgabe als Überträgerin genetischer Informationen, die sie während ihrer Neubildung an der chromosomalen DNS empfängt, das Muster für die am Ergastoplasma neugebildeten cytoplasmatischen Proteine abzugeben (DOUNCE 1953). Eine andere RNS-Fraktion wird für die „Aktivierung“ der freien Aminosäuren beim Aufbau des Proteinmoleküls benötigt (Lit. bei SIEBERT 1961). Beide RNS-Fraktionen werden anscheinend dabei verbraucht und müssen deshalb ständig vom Kern aus nachgebildet und an das Cytoplasma abgegeben werden. Je größer der EW-Umsatz einer Zelle, desto größer ist der RNS-Gehalt des Cytoplasmas (NIKLAS und OEHLERT 1956; FICQ und BRACHET 1956), und desto größer ist die Neubildungsrate im Kern, wobei allerdings einige Aus-

nahmen existieren (SCHULTZE, OEHLERT und MAURER 1961). Tatsächlich konnten wir in völliger Übereinstimmung mit den vorher besprochenen Versuchsergebnissen eine Steigerung der RNS-Neubildung im Zellkern – gemessen an der Einbauaktivität von ^3H -Cytidin in fällbare RNS – nachweisen, die im voll ausgebildeten Carcinom ihre größte Intensität erreicht.

Wenn auch die relative Größe des ^3H -Cytidin-Einbaues in fällbare RNS während der Pinselung und im Papillom sowie im Carcinom erheblich größer als in der normalen Epidermiszelle ist, so ist das Einbaumuster für die von uns gewählte Versuchszeit von 60 Minuten nach Injektion des ^3H -Cytidin das gleiche wie in der Mehrzahl aller somatischen Zellen des Organismus (OEHLERT 1961). Wir finden die stärkste Einbauaktivität bei dieser Versuchszeit im Nucleolus, wobei aber auch das übrige Kernchromatin eine deutliche Markierung erkennen läßt. Eine eindeutige Verschiebung des Verhältnisses der Inkorporationsgröße von ^3H -Cytidin pro Vol.-Einheit zwischen Nucleolus und Kernchromatin zugunsten des Kernchromatins, wie dies für die Zelle des Ascitescarcinoms gefunden wurde (LAUF, SEEMAYER und OEHLERT 1961), konnten wir in diesem Falle nicht feststellen. Das Cytoplasma ist bei dieser Versuchszeit praktisch frei von ^3H -Cytidin-Aktivität; eine merkbare Abgabe neugebildeter RNS aus dem Kern ins Cytoplasma hat demnach noch nicht stattgefunden. Stellenweise hatte man den Eindruck, als ob im Carcinom mehr Markierung im Cytoplasma als unter normalen Bedingungen nachweisbar wäre; stichprobenartig durchgeführte Auszählungen von Silberkörnern haben jedoch ergeben, daß dieser Eindruck durch die dichtere Lagerung der Zellkerne und die Verminderung des Cytoplasmas im Carcinom zustande kommt. Wir können damit feststellen – soweit dies die vorliegenden Untersuchungsergebnisse erlauben –, daß der Mechanismus der RNS-Neubildung im Kern während der Cancerisierung und im Carcinom keine Veränderungen gegenüber der Norm erfährt.

Anders liegen die Verhältnisse für die Intensität der RNS-Synthese im Kern. Wie in einer früheren Arbeit bereits beschrieben, setzt schon 2 Tage nach einmaliger Pinselung mit Methylcholanthren in der behandelten Epidermis eine Zunahme der RNS-Synthese ein (OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961). Diese Beobachtung steht in völliger Übereinstimmung mit RNS-Mengenbestimmungen, die ebenfalls bereits kurze Zeit nach Methylcholanthrenpinselung eine deutliche Zunahme der RNS-Menge in den Zellen der gepinselten Haut ergaben (GÖSSNER, ZANDER 1952; KUROIWA 1959).

Cytologischer Ausdruck dieser gesteigerten Syntheseleistung des Zellkerns sind die unmittelbar nach der Pinselung beginnenden Kern- und

Nucleolenvergrößerungen, die in weitgehender Übereinstimmung in zahlreichen licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden wurden (HAMPERL, GRAFFI und LANGER 1942; GÖSSNER und ZANDER 1952; v. ALBERTINI 1953, 1958; PILLAI und GAUTIER 1960; CHATTERJEE 1960). Auch die Bildung vermehrter ergastoplasmatischer Strukturen in der mit Methylcholanthren gepinselten Epidermiszelle muß als Folge der vermehrten Abgabe von RNS aus dem Kern ans Cytoplasma gewertet werden (PILLAI und GAUTIER 1960).

Mit zunehmender Hyperplasie erfolgt nun bis zum Papillom eine kontinuierliche Zunahme der RNS-Neubildung im Kern, wobei diese Zunahme der Vergrößerung des Zellkerns parallel verläuft, wie die vorliegenden Meßergebnisse gezeigt haben (Abb. 13). Wie in den normalen somatischen Zellen des Organismus besteht demnach auch während der Ausbildung der Hyperplasie und der Papillome eine Relation zwischen Kerngröße und Syntheseleistung des Zellkerns (OEHLERT und SCHULTZE 1960; STÖCKER 1962).

Mit der Entwicklung zum Carcinom beobachtet man eine erneute Steigerung der RNS-Neubildung im Zellkern, wobei jedoch, wie bereits erwähnt, das Einbaumuster im Kern unverändert bleibt. In gleicher Weise, wie das für die EW-Neubildung beobachtet wurde, bestehen auch für die Größe der RNS-Bildung innerhalb des Tumorgewebes erhebliche Unterschiede. Periphere Tumorabschnitte und vor allem infiltrierend in die Umgebung einwachsende Zellstränge zeigen einen weit größeren Einbau von ^3H -Cytidin als zentrale Abschnitte und verhornende Bezirke (Abb. 9, 10). Das gilt nicht nur für die Silberkornbelegung pro Gewebsfläche, die ja durch die verschiedene Kerndichte erheblich beeinflußt werden kann, sondern vor allem für die RNS-Aktivität pro Zellkern. Wir können damit nachweisen, daß dem vermehrten RNS-Gehalt der peripheren Tumorzellen (A-Zellen) (CASPERSSON 1941) eine gesteigerte RNS-Synthese im Zellkern der Tumorzelle zugrunde liegt.

Gleichzeitig finden diejenigen Untersuchungen ihre Erklärung, welche in Tumorzellen einen vermehrten RNS-Gehalt des Zellkerns und eine Verschiebung des Verhältnisses von RNS zu DNS zugunsten der RNS gefunden haben (GOLDBERG, KLEIN und KLEIN 1950; SCHNEIDER 1947). Neben dieser allgemeinen Steigerung der Syntheseleistung des Kerns im Tumorgewebe, die von zahlreichen Autoren bereits beschrieben wurde (Lit. bei GRAFFI 1959; MERTEN 1961), erscheint uns eine in vorliegenden Untersuchungen gemachte Beobachtung von Bedeutung für die Kenntnis des Stoffwechsels der Tumorzelle zu sein. Wir hatten bereits darauf hingewiesen, daß bis zum Papillom die Steigerung der RNS-Neubildung im

Kern der Zunahme des Kernvolumens parallel geht. Diese Parallelität geht im Carcinom verloren. Wie die Abbildung 8 zeigt, wird im Kern der Krebszelle weit mehr ^3H -Cytidin-Aktivität gefunden, als es das Kernvolumen erwarten ließe. Das bedeutet nichts anderes, als daß im Kern der Krebszelle pro Vol.-Einheit mehr ^3H -Cytidin eingebaut wird als in der normalen Epidermiszelle und der Zelle der hyperplastischen Haut und des Papilloms. Selbst wenn man mit STÖCKER (1962), der während einer bestimmten Funktionsphase des Pankreaszellkerns eine Zunahme der Silberkorndichte im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin beobachtete, in Erwägung zieht, daß nicht nur eine echte Steigerung der Umsatzgröße pro Vol.-Einheit, sondern auch eine unterschiedlich große Terminaladdition von Nucleotiden an bestehende RNS-Moleküle bzw. Verschiebungen der RNS-Fractionen zugunsten der höher molekularen und daher leichter fällbaren RNS für den Verlust der Relation zwischen Kerngröße und Silberkornanzahl verantwortlich sein könnte, so würde auch dies eine Veränderung des Stoffwechselverhaltens bedeuten. Untersuchungen von FEINENDEGEN u. Mitarb. (1961) unter Verwendung von ^3H -Cytidin an HeLa-Zellen haben aber ergeben, daß der im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin nachweisbaren Aktivität vorwiegend ein Einbau des Cytidin-Moleküls in RNS zugrunde liegt und daß die nach einiger Zeit im Cytoplasma nachweisbare markierte RNS mit der im Kern gebildeten weitgehend identisch ist. Unter diesen Voraussetzungen dürfen auch wir annehmen, daß die in unseren Versuchen im Kern nachweisbare Aktivität zum überwiegenden Teil markierte, das heißt in der Versuchszeit neugebildete RNS darstellt. Die Zunahme der Silberkorndichte in der Krebszelle wäre somit Ausdruck einer gesteigerten Syntheseaktivität pro Vol.-Einheit und eines Verlustes einer für die Normalzelle gültigen Stoffwechselrelation.

Wie kann man sich die in der Krebszelle gegenüber der normalen Epidermiszelle gesteigerte RNS-Neubildung pro Vol.-Einheit des Zellkerns bei gleicher DNS-Menge – gemessen an der Kerngröße – erklären? Wir wissen heute, daß in der normalen somatischen Zelle bestimmte Chromosomenabschnitte stoffwechselaktiv, andere stoffwechselinaktiv sind.

Für den Einbau von ^3H -Cytidin in RNS konnte die unterschiedliche Aktivität der entsprechenden Chromosomenabschnitte autoradiographisch direkt nachgewiesen werden (HSU 1962).

Anzahl und Lokalisation dieser eu- und heterochromatischen Bezirke im einzelnen Chromosom sind für den Zellkern der Zelle verschiedener Organe charakteristisch und bilden im cytologischen Bild das zellspezifische Chromatinmuster (GRUNDMANN und STEIN 1961). Eine Vermehrung

stoffwechselaktiver Chromosomenabschnitte auf Kosten der inaktiven würde eine Steigerung der Syntheseaktivität des gesamten Zellkerns ohne eine Veränderung der DNS-Menge und damit eine Steigerung der Syntheseleistung pro Vol.-Einheit des Zellkerns zur Folge haben. Im cytologischen Bild müßte dies mit einem Verlust des zellspezifischen Chromatinmusters einhergehen. Die Untersuchungen von GRUNDMANN und STEIN (1961) mittels der Essig-Karmin-Quetschmethode haben gezeigt, daß in der Krebszelle tatsächlich das zellspezifische Chromatinmuster verlorengeht. Die genannten Autoren haben diese Veränderung als Ausdruck der Entdifferenzierung der Intermitosechromosomen gewertet. Der in vorliegenden Ergebnissen beschriebene Verlust der Relation zwischen Kerngröße und relativer Größe der RNS-Neubildung mit der gesteigerten Syntheseaktivität pro Vol.-Einheit des Zellkerns würde somit das Äquivalent zu der veränderten Kernstruktur bilden.

Damit ist nicht gesagt, daß dieses Mißverhältnis zwischen Kerngröße und relativer Größe der RNS-Neubildung als Charakteristikum der Krebszelle überhaupt zu gelten hat. Es kann sich hierbei mit der gleichen Wahrscheinlichkeit um eine Eigenart wenig differenzierter Zellen handeln, die sich mit kurzer Lebensdauer teilen und in denen in kurzen zeitlichen Abständen DNS-Synthesen einander folgen. Wir wissen aus älteren und neueren Untersuchungen (BRACHET 1957; FEINENDEGEN und Mitarb. 1961), daß die RNS als Reservoir für Nucleotide dient, die zur DNS-Synthese benötigt werden, und daß dabei sogar cytoplasmatische RNS mit herangezogen wird. Damit würde unsere Beobachtung übereinstimmen, daß die größte RNS-Neubildung in den Zellen beobachtet wird, die in der Tumorperipherie und in infiltrierend wachsenden Zellsträngen auch die größte DNS-Synthese- und Mitoserate besitzen.

Wenn auch RNS- und Proteinmenge nicht unbedingt mit dem autoradiographisch bestimmten Umsatz übereinzustimmen brauchen, so sprechen doch vergleichende cytophotometrische Untersuchungen an normalem Plattenepithel und am Carcinom für die Annahme, daß ähnliche Verhältnisse auch für den Gehalt an cytoplasmatischer RNS bestehen (SANDRITTER 1952).

Im Dünndarm findet man nach Injektion von ^3H -Cytidin die größte Aktivitätsanreicherung in den Zellen der Lieberkühnschen Krypten, wogegen die Zottenepithelien eine deutlich geringere Einbaugröße zeigen (SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1961). Auch hier besitzen also die Zellen die stärkste RNS-Neubildung, die sich mit kurzer Lebensdauer teilen. Daß in beiden Fällen, sowohl in der Krebszelle des infiltrierend wachsenden Carcinoms als auch in der intermitotischen Dünndarmepithelzelle, die vermehrt gebildeten RNS auch der cytoplasmatischen EW-Neubildung dienen, zeigt der in beiden Zellarten große EW-Umsatz.

Abschließend kommen wir somit zu dem Ergebnis, daß sowohl die Zunahme der RNS-Neubildung insgesamt als auch der Verlust der Relation zwischen Kerngröße und RNS-Synthese in der Krebszelle Ausdruck einer verminderten Differenzierung und gesteigerten Teilungsfähigkeit sind, in ähnlicher Weise, wie ja auch im elektronenmikroskopischen Bild die Krebszelle Eigenarten der undifferenzierten embryonalen Zelle besitzt (BERNHARD 1961).

Welcher Wirkungsmechanismus liegt nun der durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe hervorgerufenen Steigerung der RNS- und EW-Synthese der Epidermiszelle zugrunde? Zunächst einmal könnte man annehmen, daß es sich hierbei um den Ausdruck eines vermehrten Zellwachstums handelt, zumal bereits bei frühen Versuchszeiten eine erhebliche Zunahme der DNS-synthetisierenden Zellen zu beobachten war (OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961). Da aber diese Zellneubildung ausschließlich im Stratum basale abläuft, sollte auch die gesteigerte RNS- und EW-Synthese auf diese Zellschicht beschränkt sein. Wie unsere Untersuchungen ergeben haben, betrifft aber die vermehrte Syntheseleistung alle Zellagen bis zum Stratum granulosum. Aus diesem Grunde erscheint es uns wahrscheinlicher, daß die Steigerung der RNS- und EW-Neubildung bei den frühen Versuchszeiten durch eine direkte Einwirkung des Cancerogens auf alle Zellen der Epidermis ausgelöst wird.

Bereits fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen hatten den Hinweis dafür erbracht, daß die cancerogenen Kohlenwasserstoffe im Cytoplasma und nicht im Kern der Epidermiszelle abgelagert würden (GRAFFI u. BIELKA 1959).

Biochemische Untersuchungsergebnisse konnten diese Annahme bestätigen und darüber hinaus nachweisen, daß sie eine Bindung an cytoplasmatische Proteine eingehen (MILLER 1951; FIALA, SPROUL u. FIALA 1955; HEIDELBERGER u. MOLDENHAUER 1956). Hierbei ist das Bindungsvermögen cancerogener Kohlenwasserstoffe größer als das nichtcancerogener Kohlenwasserstoffe (SOMERVILLE u. HEIDELBERGER 1961; DAVENPORT, ABELL u. HEIDELBERGER 1961), und die Proteinfraction, an welche die Bindung vorwiegend erfolgt, entspricht hinsichtlich ihres elektrophoretischen Verhaltens weitgehend den sogenannten „h“-Proteinen der Rattenleber, an welche cancerogene Azofarbstoffe gebunden werden (SOROF u. Mitarb. 1951, 1958).

Nimmt man auf Grund derartiger Untersuchungsergebnisse an, daß durch die Bindung von Carcinogenen an cytoplasmatische Proteine eine Inaktivierung oder Zerstörung dieser Proteine hervorgerufen wird, dann wäre es denkbar, daß die Zelle durch vermehrte Proteinsynthese bei gesteigerter RNS-Nachlieferung vom Kern diesen Proteinverlust auszugleichen versucht. Ob hierbei auch noch eine Fermentaktivierung durch das Carcinogen ins Spiel kommt, wie dies für die Wirkung des Methylocholanthrens auf die Leberzelle im Sinne eines vermehrten Einbaues

markierter Aminosäuren angenommen wird (v. d. DECKEN und HULTIN 1960), kann hier nicht entschieden werden.

Die gesteigerte Syntheseleistung der Epidermiszelle als mögliche Folge einer Proteininaktivierung oder eines verstärkten Proteinabbaues allein vermag jedoch nicht die gleichzeitig einsetzenden erheblich gesteigerten Zellneubildungsprozesse erklären, die ebenfalls unmittelbar nach der Applikation cancerogener Kohlenwasserstoffe durch die Zunahme der DNS-synthetisierenden Zellen im Stratum basale nachweisbar werden (OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961). Zwar wissen wir seit langem, daß durch vermehrten Zellverschleiß an der Geweboberfläche oder durch größere Zellverluste auch ohne Verletzung des Stratum basale eine vermehrte Zellneubildung in der Indifferenzzone des oberflächlichen Plattenepithels ausgelöst wird (OEHLERT und BLOCK 1962). In unseren eigenen und auch in den Versuchen anderer Autoren ist der durch oberflächliche Behandlung mit karzinogenen Kohlenwasserstoffen hervorgerufene Zellverlust nicht so groß, daß er die in einem derartigen Umfang einsetzende Zellneubildung erklären könnte, ganz abzusehen von der überschießenden Regeneration, die erst die Voraussetzung für die Bildung der Hyperplasie schafft. Somit wird auch die Wirksamkeit von Substanzen unwahrscheinlich, welche beim Gewebszerfall oder bei Applikation von Gewebshomogenaten in der entsprechenden Geweben Zellneubildungen (LAHTIHARJU 1961) bzw. eine Stoffwechselsteigerung (WRBA, RABES und ZINTL 1962) auslösen.

Wir wissen bis heute nicht, welcher Regulationsmechanismus für die Erhaltung der Zellkonstanz bei dauernden Zellneubildungs- und Zellabstoßungsprozessen an der Epidermis und in den anderen Wechselgeweben des Organismus sowie für den Zellersatz bei traumatischen Zellverlusten verantwortlich zu machen ist. Von einer Reihe von Untersuchern wird angenommen, daß in den sich differenzierenden Zellen des Oberflächenepithels Stoffe synthetisiert werden, welche auf die Zellneubildung im Stratum basale eine Hemmwirkung ausüben (OSGOOD 1959; BULLOUGH und LAURENCE 1960; IVERSEN 1961).

Eine Konzentrationsverminderung dieser Substanz durch Zellverluste an der Oberfläche soll vermehrte Zellneubildungen im Stratum basale auslösen, die so lange andauern, bis durch entsprechende Nachbildung differenzierter Zellen die ursprüngliche Konzentration wieder erreicht ist. Obgleich der Nachweis eines derartigen Hemmstoffes noch aussteht, sprechen auch neuere Untersuchungen (OEHLERT und BLOCK 1962) für die Wirksamkeit eines derartigen Regulationsmechanismus. Da aber, wie bereits betont, der Zellverlust nicht für die durch carcinogene

Kohlenwasserstoffe ausgelöste Hyperregeneration verantwortlich gemacht werden kann, müßte ein anderer Wirkungsmechanismus für die Konzentrationsminderung des angenommenen Hemmstoffes vorausgesetzt werden.

Unter der Annahme, daß es sich bei diesem postulierten Hemmstoff um ein von den differenzierten Zellen des Stratum spinosum synthetisiertes Protein handelt, wäre es denkbar, daß durch die Bindung des Carcinogens an dieses Protein seine Wirksamkeit verlorenght. Wie bereits besprochen, konnte durch Versuche mit radioaktiv markiertem Dibenzanthrazen gezeigt werden, daß dieses Carcinogen an die cytoplasmatischen Proteine gebunden wird (DAVENPORT, ABELL und HEIDELBERGER 1961). Wenn trotz gesteigerter Neubildung derartiger Proteine bei fortlaufender Einwirkung des Cancerogens es nicht gelingt, die notwendige Konzentration unveränderter Proteine aufrechtzuerhalten, wäre unter den gegebenen Voraussetzungen die verstärkte Zellneubildung im Stratum basale verständlich.

Diese hier entwickelte Hypothese könnte sowohl die während der Kanzerisierung zu beobachtende gesteigerte Syntheseaktivität aller Zellen der Epidermis als auch die zur Hyperplasie führende vermehrte Zellneubildung im Stratum basale erklären. Sie hätte jedoch in gleicher Weise auch für die durch nichtcancerogene Substanzen zu erzeugende Hyperplasie Gültigkeit, bei der ebenfalls Kern- und Nucleolenvergrößerung als Ausdruck einer gesteigerten synthetischen Aktivität der Einzelzelle zu beobachten sind. Wie die Ergebnisse vorliegender Untersuchungen ergeben haben, geht die Steigerung der RNS-Neubildung im Zellkern bis zum Papillom weitgehend der Zunahme des Kernvolumens parallel. Es handelt sich demnach dabei um eine im physiologischen Bereich liegende Steigerung der Syntheseaktivität, die durch eine Zunahme der Chromosomenhydratation oder aber durch eine Vermehrung der chromosomalen DNS durch Polyploidisierungsvorgänge mit entsprechenden Kernvergrößerungen erreicht wird. Die relative Größe der RNS-Neubildung pro Vol.-Einheit, gemessen an der Silberkorndichte im Autoradiogramm, bleibt dabei weitgehend konstant. Mit dem Beginn des Carcinoms ändert sich diese Relation grundlegend.

Jetzt wird im Zellkern mehr RNS synthetisiert, als es das Kernvolumen erwarten ließe, das heißt, die Syntheseleistung pro Vol.-Einheit nimmt zu. Gleichzeitig verliert die Zelle weitgehend ihre Differenzierungsfähigkeit und behält dabei ihre Fähigkeit zur DNS-Synthese bei. Diese Veränderungen, die für den Übergang der normalen Epidermiszelle in die Carcinomzelle charakteristisch sind, lassen sich mit der vorher diskutierten

Hypothese nicht erklären. Wohl muß auch für die entdifferenzierte Krebszelle angenommen werden, daß sie nicht mehr in der Lage ist, einen Hemmstoff für die Zellneubildung zu bilden, doch spielt hierbei die Wirkung des Carcinogens keine Rolle mehr. Sowohl die gegenüber der Muttergewebe weiterhin gesteigerte EW- und RNS-Neubildung und der Verlust einer Relation zwischen Kerngröße und Syntheseleistung als auch die Beibehaltung der Fähigkeit zur DNS-Neubildung und die verkürzte Generationszeit (OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER 1961) sprechen dafür, daß hier eine neue Zellart existiert, die nicht nur hinsichtlich ihrer Form und Struktur, sondern auch hinsichtlich ihres Stoffwechsels sich anders als die ursprüngliche Epidermiszelle verhält.

Alle diese Eigenschaften der Krebszelle zusammen mit der Tatsache, daß diese Besonderheiten auf die folgenden Zellgenerationen übertragen werden, sprechen für die Annahme, daß der entscheidende Umschlag von der normalen Epidermiszelle zur Krebszelle durch eine Veränderung der Zellspezifität, das heißt der chromosomalen DNS hervorgerufen wird. Daß bei dieser zu fordernden Veränderung an der genetischen Substanz der Epidermiszelle der zur Hyperplasie führende Mechanismus der Hyperregeneration eine Rolle spielt, beweist die Tatsache, daß sowohl bei der experimentellen Krebserzeugung als auch bei der Entstehung von menschlichen Hautcarcinomen stets Hyperplasien oder hyperregeneratorische Prozesse dem Ausbruch des Carcinoms vorgeschaltet sind. Weiter weisen sowohl die Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung als auch die Beobachtungen in der menschlichen Tumorpathologie auf die Tatsache hin, daß nur solche Zellen zur krebsigen Umwandlung befähigt sind, die ihre Fähigkeit zur DNS-Synthese beibehalten haben. Zusammen mit der Überlegung, daß nur die Zellen des Stratum basale in der Lage sind, eine durch äußere Einwirkungen hervorgerufene Schädigung an folgende Zellgenerationen weiterzugeben, sprechen alle die angeführten Tatsachen dafür, daß diese intermitotischen Zellen der Indifferenzzone als eigentliche Mutterzellen des Epidermiscarcinoms anzusehen sind (siehe auch BERENBLUM 1960).

Zusammenfassung

Bei männlichen weißen Mäusen wurden durch Pinselung mit 0,25% Methylcholanthren-Benzol-Lösung Hyperplasien der Epidermis, Papillome und verhornende Plattenepithelcarcinome erzeugt. Nach einmaliger Pinselung und an der voll ausgebildeten Hyperplasie sowie im Papillom und im Carcinom wurde nach Injektion von ^3H -Leucin und ^3H -Cytidin der EW- und RNS-Umsatz untersucht.

Bereits nach einmaliger Pinselung erfolgt eine deutliche Steigerung der cytoplasmatischen EW-Synthese und der RNS-Neubildung im Zellkern aller Zellen der Epidermis. Dabei geht das Einbaumuster für ^3H -Leucin des normalen mehrschichtigen Plattenepithels verloren. Eine weitere Steigerung der EW- und RNS-Neubildung wurde im Papillom und im Carcinom beobachtet. Das Einbaumuster des ^3H -Cytidin im Kern der Einzelzelle ändert sich auch in der voll ausgebildeten Krebszelle nicht. Wie in der normalen Epidermiszelle ist der Nucleolus Ort des stärksten Einbaues. Während bis zum Papillom die relative Größe der RNS-Synthese – gemessen am Einbau von ^3H -Cytidin in fallbare RNS – der Zunahme der Kerngröße parallel geht, wird in der Krebszelle mehr RNS synthetisiert, als es die Kerngröße erwarten ließe.

In peripheren Tumorabschnitten sind EW- und RNS-Neubildung größer als in zentralen oder verhornenden Gewebsbezirken. Als Ursache für die Stoffwechselsteigerung der Epidermis während der Behandlung mit einem Carcinogen wird eine Wirkung des polyzyklischen Kohlenwasserstoffes auf cytoplasmatische Proteine angenommen. Als Ursache für die zur Hyperplasie führende Zellvermehrung wird eine Schädigung der postmitotischen Zellen mit einem Verlust der Fähigkeit zur Bildung mitosehemmender Stoffe diskutiert.

Summary

Epidermal hyperplasia, papillomata and keratinised epithelial carcinomata were produced in male white mice by painting with 0.25% solutions of methylcholanthrene in benzol. The albumin and ribonucleic acid metabolism were measured by injection of ^3H -Leucin and ^3H -Cytidin, after single treatments and after a fully formed hyperplasia, papilloma, or carcinoma.

There was a significant rise in albumin metabolism in the cytoplasm and in the RNA synthesis of the nucleus after a single treatment, in all cells of the epidermis. In the course of this, the normal pattern of ^3H -Leucin uptake in the stratified squamous epithelium, is lost. A further rise in the albumin and RNA synthesis was noted in papillomata and carcinomata. There was no change in the pattern of uptake of ^3H -Cytidin by the nucleus even in fully formed cancer cells. The nucleolus is the site of maximum uptake, as in the normal cell. While the relative rate of RNA synthesis—measured as the uptake of ^3H -Cytidin in the precipitable RNA fraction—runs parallel with the increase in size of the nucleus in the papilloma, the RNA production in the cancer cell is greater than would be expected from the size of the nucleus.

Albumin and RNA synthesis are greater in peripheral sections of the tumor than at the centre or in keratinised tissues. The rise in metabolism of the epidermis during treatment with a carcinogen is ascribed to an action of the polycyclic hydrocarbon on the cytoplasmic proteins. The cause of the increase in cells which leads to the hyperplasia is discussed in relation to damage to the post-mitotic cells which may lose their ability to form mitosis inhibiting substances.

Résumé

Des hyperplasies de l'épiderme, des papillomes et des cancers kératinisés de l'épithélium pavimenteux ont été provoqués chez des souris blanches mâles par badigeonnage de la peau avec une solution à 0,25% de méthylcholanthrène benzolique. Après un seul badigeonnage, l'hyperplasie complètement développée ainsi que le papillome et le cancer furent étudiés quant au métabolisme d'albumine et à l'acide ribonucléinique (ARN) après injection de ^3H -Leucine et de ^3H -Cytidine. Déjà après un seul badigeonnage l'augmentation de la synthèse d'albumine du cytoplasme est nette comme également la formation d'ARN nouveau dans les noyaux de toutes les cellules de l'épiderme. Le mode d'incorporation de la ^3H -Leucine de l'épithélium pavimenteux normal à plusieurs couches s'altère ainsi jusqu'à se perdre complètement. — L'auteur constata ensuite une augmentation plus forte de la formation d'albumine et d'ARN nouveaux dans le papillome et dans le cancer. Même dans la cellule cancéreuse complètement développée le mode d'incorporation de la ^3H -Cytidine dans le noyau d'une cellule ne se modifie pas. — Comme dans la cellule normale de l'épiderme, l'incorporation a lieu principalement dans le nucléole. Jusqu'à la phase du papillome l'importance relative de la synthèse d'ARN — mesurée par la fixation de ^3H -Cytidine dans l'ARN précipitable — évolue parallèlement à l'augmentation des dimensions du noyau, — mais dans la cellule cancérisée elle-même la synthèse d'ARN est plus forte que les dimensions du noyau ne le feraient supposer. Dans les secteurs périphériques de la tumeur la formation d'albumine et d'ARN est plus intense que dans les secteurs centraux et dans ceux qui sont en voie de kératinisation. — On suppose que l'augmentation du métabolisme de l'épiderme pendant le traitement par un carcinogène serait provoquée par l'effet du carbohydrate polycyclique sur les protéines du cytoplasme.

L'auteur pense que la cause de la prolifération cellulaire conduisant à l'hyperplasie serait une lésion des cellules post-mitotiques entraînant la perte de la capacité de former des substances inhibitrices de la mitose — et il discute cette théorie.

Literatur

- V. ALBERTINI, A., Electron microscopic study of epidermal carcinoma induced by methylcholanthrene in the mouse. *J. Nat. Cancer Inst.* **13**, 1473 (1953).
- , Studien zur Karzinogenese II. Experimentelles Hautkarzinom mit Methylcholanthren. *Schweiz. Zschr. Path. Bact.* **21**, 770 (1958).
- ARLEY, N. and IVERSEN, S., On the mechanism of experimental carcinogenesis III. further development of the hit theory of carcinogenesis. *Acta path. microbiol. Scand.* **30**, 21 (1952).
- BERENBLUM, I., Carcinogenesis in relation to skin cancer. *Med. J. Austr. Nov.* **5**, 721 (1960).
- BERNHARD, W., Elektronenmikroskopischer Beitrag zum Studium der Kanzerisierung und der malignen Zustände der Zelle. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 45. Tagg. **8**, 1961.
- BRACHET, J., *Biochemical Cytology*. Academic Press, New York, 1957.
- BÜCHNER, F., Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner morphologischer Methoden. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 45. Tagg. **37**, 1961.
- BULLOUGH, W. S. and LAURENCE, E. B., The control of mitotic activity in mouse skin. *Exper. Cell Res.* **21**, 394 (1960).
- CASPERSSON, T., Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Naturwissenschaften* **29**, 33 (1941).
- , *Cell growth and Cell function*, Norton, New York 1950.
- , NYSTRÖM, CL. und SANTESSON, L., Zytoplasmatische Nukleotide in Tumorzellen. *Naturwissenschaften* **29**, 29 (1941).
- CHATTERJEE, J., An electron microscopic study of methylcholanthrene treated hyperplasia of the mouse skin. *Ind. J. Dermatol.* **IV**, 69 (1959).
- DAMMERT, K., Zur Histologie der chemischen Hautcarcinogenese im Lichte der Zweiphasenhypothese untersucht an Mäusen. *Acta path. microbiol. Scand. Supp.* **124**, 1957.
- DAVENPORT, G. R. and HEIDELBERGER, CH., The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. VII. Fractionation of mouse skin proteins. *Cancer Res.* **21**, 599 (1961).
- V. DECKEN, A. and HULTIN, T., Inductive Effects of 3-Methylcholanthrene on Enzyme Activities and Amino Acid Incorporation Capacity of Rat Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 201 (1960).
- DEELMAN, H. T., Über die Histogenese des Teerkrebses. *Zschr. Krebsforsch.* **19**, 125 (1923).
- DOUNCE, A. L., Cuplicatin mechanism for peptide chain and nucleic synthesis. *Enzymologia* **15**, 251 (1953).
- EVENSEN, A., Changes in the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) and in mitotic counts in epidermis of hairless mice after a single application of one per cent 3-methylcholanthrene in benzene. *Acta path. microbiol. Scand. Supp.* **43**, 1961.
- FEINENDEGEN, L. E., BOND, V. P. and HUGHES, W. I., RNA mediation in DNA-Synthesis in HeLa Cells studied with tritium labeled cytidine and thymidine. *Exper. Cell Res.* **25**, 627 (1961).
- , SHREEVE, W. W. and PAINTER, B. B., RNA and DNA metabolism in human tissue culture cells studied with tritiated cytidine. *Exper. Cell Res.* **19**, 443 (1960).
- FIALA, S., SPROUL, E. E. and FIALA, A. E., Accumulation of Benzpyrene in cytoplasmic granules of mouse skin. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **2**, 15 (1955).
- FICQ, A. and BRACHET, J., Distribution de l'acide ribonucléique et incorporation de la phénylalanine-2-C¹⁴ dans les protéines. *Exper. Cell Res.* **11**, 135 (1956).
- FITZGERALD, P. J. and VINIJAIAKUL, K., Nucleic acid metabolism of pancreatic cells as revealed by cytidine-³H and thymidine-³H. *Laborat. Invest.* **8**, 319 (1959).
- GOLDBERG, L., KLEIN, E. and KLEIN, G., The nucleic acid content of mouse ascites tumor cells. *Exper. Cell Res.* **1**, 543 (1950).
- GOLDSTEIN, L. and MICOU, J., Autoradiographic study of interrelation of nuclear- and cytoplasmic ribonucleic acid. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 1 (1959).

- GÖSSNER, W. und ZANDER, J., Histochemische Untersuchungen über das Verhalten der Ribonukleinsäuren in der Epidermis des Mäuseohres nach einmaliger Methylcholanthren-Behandlung. *Zschr. Naturforsch.* **7b**, 398 (1952).
- GRAFFI, A. und BIELKA, H., Probleme der experimentellen Krebsforschung. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig **1959**.
- GRUNDMANN, E. und STEIN, P., Über das organspezifische Chromatin im normalen und im carcinomatösen Parenchymzellkern. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 45. Tagg. **93**, 1961.
- HAMPERL, H., GRAFFI, A. und LANGER, E., Zur Kenntnis der Wirkungsweise des Benzpyrens auf die Mäusehaut. *Zschr. Krebsforsch.* **53**, 133 (1943).
- HEIDELBERGER, C. and WIEST, W. G., The rate of fecal elimination of radioactivity following a single application of 1, 2, 5, 6-Dibenzanthracene-9-10-C¹⁴ to the skin of mice. *Cancer Res.* **11**, 255 (1951).
- HSU, T. C., Differential Rate in RNA-Synthesis between Euchromatin and Heterochromatin. *Exper. Cell Res.* **27**, 332 (1962).
- IVERSEN, O. H., The regulation of cell numbers in epidermis. A cybernetic point of view. *Acta path. microbiol. Scand. Suppl.* **148**, 91 (1961).
- IVERSEN, S. and EDELSTEIN, J. M., On the mechanism of experimental carcinogenesis. 4. The early mitotic effect of 9-10-dimethyl-1-2-benzanthracene and of 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene on epidermal cells of the mouse ear. *Acta path. microbiol. Scand.* **30**, 213 (1952).
- KUROIWA, W., A histochemical study of experimental skin carcinogenesis in mice. *Acta med. Jap. (Igaku kenkyu)* **29**, 266 (1959).
- LAHTIHARJU, A., Influence of autolytic and necrotic liver tissue on liver regeneration in rat. *Acta path. microbiol. Scand. Suppl.* **150**, 99 (1961).
- LAUF, P., SEEMAYER, N. und OEHLERT, W., Die Größe und der zeitliche Verlauf der RNS-Synthese in den Ehrlich-Aszites-Tumorzellen der weißen Maus. *Zschr. Krebsforsch.* **64**, 490 (1962).
- MAURER, W., Über die Größe des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiß. 10. Mosbacher Colloquium **1**, 1959.
- MERTEN, R., Enzyme und Krebs: Über einige enzymologische Besonderheiten der Tumorzelle. *Mitteilungsdienst d. Ges. zur Bek. der Krebskrankh. Nordrh.-Westf.* **II**, 313 (1961).
- MILLER, E. C., Studies on the formation of protein-bound derivatives of 3,4-Benzpyrene in the epidermal fractions of mouse skin. *Cancer Res.* **11**, 100 (1951).
- NIKLAS, A. und OEHLERT, W., Autoradiographische Untersuchung der Größe des Eiweiß-Stoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. *Beitr. path. Anat.* **116**, 92 (1956).
- NISKANEN, E. E. und MERENMIES, L., Morphological effect on mouse skin of orally administered carcinogens. *Naturwissenschaften* **46**, 583 (1959).
- OEHLERT, W., Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure-Synthese in den verschiedenen Strukturen der Zelle. *Beitr. path. Anat.* **124**, 311 (1961).
- und BLOCK, P., Der Mechanismus und zeitliche Ablauf der reparativen Regeneration in Gewebe mit post- und intermitotischem Zellbestand. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 46. Tagg. **333**, 1962.
- und COTÉ, J., Developmental stages of mouse squamous cell carcinoma: autoradiographic investigations using ³H-Thymidine ³H-Cytidine and ³H-Leucine. The morphological precursors of cancer. *Div. of cancer res. Perugia* **1962**, 541.
- — und BÜCHNER, F., Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung. *Beitr. path. Anat.* **125**, 280 (1961).
- und SCHULTZE, B., Die Kerngröße als Ausdruck der synthetischen Aktivität des Kerns. *Beitr. path. Anat.* **123**, 101 (1960).
- ORR, J. W., The changes antecedent to tumour formation during the treatment of mouse skin carcinogenic hydrocarbons. *J. Path. Bact.* **46**, 1938.
- OSGOOD, E. E., Regulation of cell proliferation. F. STOHLMAN: The kinetics of cellular proliferation. Grune & Stratton, New York and London **1959**.
- PILLAI, P. A. und GAUTIER, A., A preliminary note on the electron microscopy of induced epidermal hyperplasia in the newt. *Oncologia* **13**, 303 (1960).

- SANDRITTER, W., Über den Nukleinsäurestoffwechsel in Plattenepithel- und kleinzelligen Bronchialcarcinomen. *Frankf. Zschr. Path.* **63**, 387 (1952).
- , Ultraviolettmikrospektrophotometrische Untersuchungen an Plattenepithel. *Frankf. Zschr. Path.* **64**, 520 (1953).
- SCHNEIDER, W. C., Phosphorus compounds in animal tissues I: The nucleic acid content of homologous normal and cancer tissue. *Cancer Res.* **5**, 717 (1945).
- SCHULTZE, B., OEHLERT, W. und MAURER, W., Vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -, C-14- und S-35-markierten Aminosäuren zur Größe des Eiweißstoffwechsels einzelner Gewebe und Zellarten bei Maus, Ratte und Kaninchen. *Beitr. path. Anat.* **122**, 406 (1960).
- — —, Über eine allgemeine Beziehung zwischen der Umsatzrate der Ribonukleinsäure und des Eiweißes im Organismus von Maus und Ratte. *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 35 (1961).
- SETÄLÄ, K., Visualization of dormant cellular features in mouse epidermis correlated with skin tumor evolution. *Acta path. microbiol. Scand. Suppl.* **155**, 1962.
- , MERENMIES, L., NISKANEN, E. E., NYHOLM, M. and STJERNVALL, L., Mechanism of experimental tumorigenesis. VI. Ultrastructural alterations in mouse epidermis caused by locally applied carcinogen and dipoletype tumor promoter. *J. Nat. Cancer Inst.* **25**, 1155 (1960).
- , NISKANEN, E. E., MERENMIES, L., NYHOLM, M. and STJERNVALL, L., Mechanism of experimental tumorigenesis VIII. Ultrastructural alterations in mouse epidermis caused by carcinogen administered orally. *J. Nat. Cancer Inst.* **26**, 985 (1961).
- SIEBERT, G., Gewebssproliferation und Zellstrukturen in biochemischer Sicht. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 45. Tagg. **59**, 1961.
- SISKEN, J. E. and KINOSITA, R., Intranuclear incorporation of tritiated cytidine. *Exper. Cell Res.* **24**, 168 (1961).
- SOMERVILLE, A. R. and HEIDELBERGER, CH., The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. VI. Studies on zero-time binding to proteins. *Cancer Res.* **21**, 581 (1961).
- SOROF, S. and COHEN, P. P., Electrophoretic and ultracentrifugal studies on the soluble proteins of various tumors and of livers from rats fed 4-Dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **11**, 376 (1951).
- —, MILLER, E. C. and MILLER, J. A., Electrophoretic studies on the soluble proteins from livers of rats fed aminoazo dyes. *Cancer Res.* **11**, 383 (1951).
- , YOUNG, E. M. and OTT, M. G., Soluble liver h-Proteins during hepatocarcinogenesis by aminoazo dyes and 2-Acetylaminofluorene in the rat. *Cancer Res.* **18**, 33 (1958).
- STÖCKER, E., Autoradiographische Untersuchungen zur Deutung der funktionellen Kernschwellung am exokrinen Pankreas. *Zschr. Zellforsch.* **57**, 47 (1962).
- , Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure und Eiweiß-Synthese im nuklearen Funktionsformwechsel der exokrinen Pankreaszelle. *Zschr. Zellforsch.* **57**, 145 (1962).
- WRBA, H., RABES, H. und ZINTL, W., Zur Biologie induzierter Wachstumsvorgänge in der Leber in vivo und im Explantat. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 12 (1962).

LEBENS LAUF

Am 8. März 1936 wurde ich in Freiburg im Breisgau als Sohn des Privatdozenten Dr. med. Heinz v. Pein und seiner Ehefrau Dorothee geb. Siebeck geboren. 1945 zog meine Familie nach Offenburg. Hier beendete ich die Volksschule und ging anschließend 9 Jahre auf das humanistische Grimmelshausen-Gymnasium. Nach der Reifeprüfung 1955 begann ich mit dem Medizinstudium. Die ersten 3 Semester der vorklinischen Studien hörte ich in Bonn, die nächsten 2 Semester in Heidelberg, wo ich im Frühjahr 1957 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Je 2 klinische Semester verbrachte ich dann in München, Berlin und Heidelberg. 1960 beschloß ich in Heidelberg das Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen.

Nach 5/4jähriger Ausbildung am Pathologischen Institut der Universität Freiburg bekam ich ein Rotary-Stipendium nach Amerika, wo ich seitdem in Little Rock/Arkansas, St.-Vincent-Hospital, arbeite.

